



**ANA CRISTINA FREITAS DE OLIVEIRA MEIRA**

**APPLICATION OF EMERGING CRYOPROTECTANTS IN  
FROZEN FOOD**

**LAVRAS – MG**

**2024**

**ANA CRISTINA FREITAS DE OLIVEIRA MEIRA**

**APPLICATION OF EMERGING CRYOPROTECTANTS IN FROZEN FOOD**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Meira, Ana Cristina Freitas de Oliveira.

Application of emerging cryoprotectants in frozen food / Ana  
Cristina Freitas de Oliveira Meira. - 2024.

114 p. : il.

Orientador(a): Jaime Vilela de Resende.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Nanofibras de celulose. 2. Hidrolisado de gelatina. 3.  
Alimentos congelados. I. Resende, Jaime Vilela de. II. Título.

**ANA CRISTINA FREITAS DE OLIVEIRA MEIRA**

**APPLICATION OF EMERGING CRYOPROTECTANTS IN FROZEN FOOD**

**APLICAÇÃO DE CRIOPROTETORES EMERGENTES EM ALIMENTOS  
CONGELADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 06 de junho de 2024.

Dr. Jaime Vilela de Resende	UFLA
Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo	UFLA
Dr. Eduardo Mendes Ramos	UFLA
Dra. Isabelle Cristina Oliveira Neves	UFSCAR
Dr. Vivaldo Silveira Júnior	UNICAMP

---

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2024**

*À Deus que é o Senhor da minha vida.  
Ao meu amor, Marcos.  
Aos meus pais Dalma e Adimar  
Ao meu irmão Paulo Cesar e minha irmã  
Gabriela juntamente com seu marido Hudson  
e seus filhos Vitor Hugo e Higor.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, que é meu Senhor sempre guia minha vida e me fortalece perante os desafios.

Ao meu marido Marcos, por todo amor, incentivo, conselhos e paciência.

Aos meus pais Adimar e Dalma que sempre estão ao meu lado me incentivando a alcançar meus sonhos.

Ao meu irmão Paulo Cesar e minha irmã Gabriela juntamente com seu marido Hudson e filhos Vitor Hugo e Higor, pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Refrigeração de Alimentos, por todo auxílio na execução do trabalho, pela amizade e momentos de descontração. Em especial, à minha amiga Larissa pela amizade, companheirismo e toda ajuda ao longo do trabalho.

À Carine pela disponibilidade e contribuição na elaboração das nanofibras de celulose.

À Bruna pela disponibilidade e contribuição nas análises de oxidação lipídica e eletroforese.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA), pela estrutura e oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo ao doutorado, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Orientador Dr. Jaime Vilela de Resende pela confiança, paciência, colaboração, ensinamentos, orientações e todas as sugestões durante estes anos.

Ao professor Dr. Eduardo Mendes Ramos por toda contribuição e disponibilidade para execução de análises.

Ao professor Dr. Carlos Wanderlei Piler de Carvalho pela disponibilidade em realizar as análises térmicas.

À professora Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo por toda a disponibilidade.

Aos demais colegas, professores e técnicos dos demais laboratórios que cederam espaço ou material para realização da pesquisa.

A todos que contribuíram de algum modo para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!!!**

## RESUMO

O congelamento é uma técnica de conservação de alimentos amplamente empregada, pois permite armazenar os produtos por um longo período. Apesar de seus benefícios, o congelamento pode ocasionar prejuízos estruturais aos produtos de origem animal e vegetal, devido à formação dos cristais de gelo. Os danos mecânicos causados por eles podem favorecer a oxidação lipídica e proteica, além de promover a perda de textura, perda de água e compostos hidrossolúveis no descongelamento. Visando reduzir esses danos em alimentos congelados, agentes crioprotetores podem ser empregados. Neste contexto, a presente tese objetivou avaliar o potencial crioprotetor de nanofibras de celulose (CNF) e hidrolisado de gelatina (GH) e analisar os impactos da adição desses compostos nas características físico-química e microestruturais de alimentos de origem vegetal e animal. O trabalho foi dividido em dois artigos. No primeiro artigo foi avaliado o potencial crioprotetor combinado de diferentes concentrações de CNF (0,08 a 4,32 % m/m) e GH (0,08 a 4,32 % m/m) impregnados em batata palito congelada. Neste artigo, foi observado que a solução impregnantes contendo 2,20 % m/m de CNF e 2,20 % m/m de GH resultou em batatas com menores perdas de fluidos celulares por descongelamento ( $19,06 \pm 0,51$  % e  $28,71 \pm 0,21$  %, respectivamente) e alteração na textura ( $23,30 \pm 0,54$  % e  $41,95 \pm 0,55$  %, respectivamente) quando submetidas ao congelamento com e sem flutuação de temperatura. Este tratamento apresentou reduzidas perdas microestruturais e de coloração quando comparado à amostra controle (isenta de crioprotetores). No segundo artigo foram avaliadas diferentes concentrações de CNF (2, 4 e 6 % m/m) em *surimi-like* de frango, além de um controle positivo contendo crioprotetores comerciais (sacarose, sorbitol e tripolifosfato de sódio) e um controle negativo isento de crioprotetores. Foi observado uma menor oxidação proteica no *surimi-like* contendo 2 % m/m de CNF em relação ao controle negativo e aos demais tratamentos contendo CNF, evidenciado pela alta concentração de proteínas solúveis em sal ( $9,62 \pm 1,13$  mg/g), menor carbonilação das proteínas ( $1,85 \pm 0,27$  nmol/mg) e poucas alterações na estrutura secundárias das proteínas miofibrilares. O *surimi-like* adicionado de 2 % m/m de CNF possuiu menores perdas de água por descongelamento ( $6,12 \pm 0,21$  %) e cocção ( $30,24 \pm 2,20$  %) gerando géis com elevada capacidade de retenção de água ( $86,78 \pm 1,56$  %) e mastigabilidade, e microestrutura mais homogênea. Em ambos os estudos os resultados indicaram que GH e CNF possuem potencial eficaz de criopreservação de alimentos.

**Palavras-chave:** Nanofibras de celulose; Hidrolisado de gelatina; Alimentos congelados; Batata; *Surimi-like*.

## ABSTRACT

Freezing is an extremely useful food preservation technique, as it allows you to store products for a long period. Despite its benefits, freezing can cause structural damage to products of animal and vegetable origin, due to the formation of ice crystals. The mechanical damage caused by them can favor lipid and protein oxidation, in addition to promoting loss of texture, loss of water and water-soluble compounds during defrosting. To reduce this damage to frozen foods, cryoprotective agents can be used. In this context, the present thesis aims to evaluate the cryoprotective potential of cellulose nanofibers (CNF) and gelatin hydrolysate (GH) and analyze the impacts of the addition of these compounds on the physicochemical and microstructural characteristics of foods of plant and animal origin. The work was divided into two articles. In the first article, the combined cryoprotective potential of different concentrations of CNF (0.08 to 4.32 % m/m) and GH (0.08 to 4.32 % m/m) impregnated on frozen potato sticks was evaluated. In this article it was presented that the impregnating solution containing 2.20 % m/m of CNF and 2.20 % m/m of GH is effective in potatoes with lower losses of cellular fluids during thawing ( $19.06 \pm 0.51$  % and  $28.71 \pm 0.21$  %, respectively) and change in texture ( $23.30 \pm 0.54$  % and  $41.95 \pm 0.55$  %, respectively) when subjected to freezing with and without temperature fluctuation. This treatment showed reduced microstructural and color losses when compared to the control sample (free of cryoprotectants). In the second article, different concentrations of CNF (2, 4 and 6 % m/m) were evaluated in surimi-like chicken, in addition to a positive control containing commercial cryoprotectants (sucrose, sorbitol and sodium tripolyphosphate) and a negative control free of cryoprotectants. Lower protein oxidation was observed in the surimi-like containing 2 % m/m of CNF in relation to the negative control and other treatments containing CNF, evidenced by the high concentration of salt-soluble proteins ( $9.62 \pm 1.13$  mg/g), lower protein carbonylation ( $1.85 \pm 0.27$  nmol/mg) and few changes in the secondary structure of myofibrillar proteins. The surimi-like added with 2 % m/m of CNF showed lower water losses due to thawing ( $6.12 \pm 0.21$  %) and cooking ( $30.24 \pm 2.20$  %) generating gels with high water retention capacity water ( $86.78 \pm 1.56$  %) and chewiness, and more homogeneous microstructure. In both studies, the results indicated that GH and CNF have effective potential for food cryopreservation.

**Keywords:** Cellulose nanofibers; Gelatin hydrolysate; Frozen food; Potato; *Surimi-like*.

## INDICADORES DE IMPACTO

Os alimentos apresentam alta perecibilidade, devido ao seu elevado conteúdo de água e nutrientes. Uma técnica de conservação eficaz desses produtos por um longo período de armazenamento é o congelamento. Essa operação unitária permite que o setor alimentício ofereça aos consumidores alimentos seguros com características físico-químicas e sensoriais ligeiramente alteradas. O congelamento permite imobilizar a água presente nas matrizes alimentares retardando as reações químicas, enzimáticas e crescimento microbiológico. Entretanto, a formação dos cristais de gelo durante o resfriamento promove danos estruturais aos alimentos de origem animal e vegetal, resultando em perdas sensoriais e nutricionais. Esse problema é intensificado quando ocorre o processo de flutuação de temperatura ao longo do armazenamento, gerando o fenômeno de recristalização do gelo. Uma forma de minimizar esse problema é aplicando crioprotetores durante o processo produtivo desses produtos. Assim, a presente tese objetivou investigar o potencial crioprotetor de nanofibras de celulose (CNF) e hidrolisado de gelatina (GH) e analisar os impactos da adição desses compostos nas características físico-química e microestruturais de alimentos de origem vegetal e animal. A combinação de nanofibras de celulose (2,20 % m/m) e o hidrolisado de gelatina (2,20 % m/m) apresentaram elevado potencial de criopreservação em batatas congeladas, reduzindo os danos microestruturais e conseqüentemente a perda de fluidos celulares ( $19,06 \pm 0,51$  %) e textura ( $23,30 \pm 0,54$  %). E a aplicação apenas de nanofibras de celulose (2 % m/m) em *surimi-like* de carne mecanicamente separada de frango atuou reduzindo a oxidação proteica, uma vez que, alta concentração de proteínas solúveis em sal ( $9,62 \pm 1,13$  mg/g), menores perdas de água por descongelamento ( $6,12 \pm 0,21$  %) e cocção ( $30,24 \pm 2,20$  %), elevada capacidade de retenção de água ( $86,78 \pm 1,56$  %) e estrutura proteica firme foram observados. Os resultados indicaram que as nanofibras de celulose e o hidrolisado de gelatina são crioprotetores promissores para substituir os açúcares, que são substâncias tradicionalmente empregados que atribuem aos produtos valor calórico e sabor adocicado indesejados. Assim, além de minimizar as perdas físico-químicas, sensoriais e nutricionais das matrizes alimentares as nanofibras de celulose e o hidrolisado de gelatina apresentam baixo custo industrial impactando positivamente nos âmbitos tecnológicos e econômicos da indústria de alimentos.

## IMPACT INDICATORS

Food is highly perishable due to its high water and nutrient content. An effective technique to preserve these products for a long storage period is freezing. This unitary operation allows the food sector to provide consumers with safe food with altered physical-chemical and sensory characteristics. Freezing allows the water present in food matrices to be immobilized, delaying chemical and enzymatic reactions and microbiological growth. However, the formation of ice crystals during cooling causes structural damage to foods of animal and vegetable origin, resulting in sensory and nutritional losses. This problem is intensified when the temperature oscillation process occurs throughout storage, generating the appearance of ice recrystallization. One way to minimize this problem is through the application of cryoprotectants during the production process of these products. Thus, the present thesis aimed to investigate the cryoprotective potential of cellulose nanofibers (CNF) and gelatin hydrolysate (GH) and analyze the impacts of ingesting these compounds on the physicochemical and microstructural characteristics of foods of plant and animal origin. The combination of cellulose nanofibers (2.20 % m/m) and gelatin hydrolysate (2.20 % m/m) showed high potential for cryopreservation in frozen potatoes, reducing microstructural damage and consequently the loss of cellular fluids ( $19.06 \pm 0.51$  %) and texture ( $23.30 \pm 0.54$  %). The application of only cellulose nanofiber (2 % m/m) to mechanically separated surimi-like chicken meat actively weakened protein oxidation, since the high concentration of salt-soluble proteins ( $9.62 \pm 1.13$  mg/g), smaller amounts of water were distributed losses due to thawing ( $6.12 \pm 0.21$  %) and cooking ( $30.24 \pm 2.20$  %), high water retention capacity ( $86.78 \pm 1.56$  %) and firmer protein structure. The results indicated that cellulose nanofibers and gelatin hydrolysate are promising cryoprotectants to replace sugars, traditionally used substances that attribute unwanted caloric value and sweet flavor to products. Thus, in addition to minimizing the physical-chemical, sensorial and nutritional losses of food matrices such as cellulose nanofibers and gelatin hydrolysate, they present low industrial costs, positively impacting the technological and economic aspects of the food industry.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Estrutura da molécula de água .....	17
Figura 2 - Ligações de hidrogênio no gelo .....	18
Figura 3 - Morfologia hipotética de um cristal de gelo .....	19
Figura 4 - Curva de congelamento típica .....	20
Figura 5 - Curva de congelamento de alimentos .....	21
Figura 6 - Três mecanismos de recristalização do gelo.....	23
Figura 7 - Eletromicrografia de transmissão da parede celular de fruto de goiabeira (10.000x) .....	25

### SEGUNDA PARTE

#### Artigo 1

Figura 1 - (a) Sulphate-polyacrylamide electrophoresis gel (SDS-PAGE) analysis of fish skin gelatin hydrolysate. (1) Molecular marker and (2) Gelatin hydrolysate (GH); (b) Infrared absorption spectra of fish skin gelatin hydrolysate.....	56
Figura 2 - (a) Scanning electron micrograph at 50,000x magnification of the cellulose nanofibers (CNF); (b) Size distribution of CNF diameters .....	57
Figura 3 - Differential scanning calorimetry curves of freezing ( $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) and melting ( $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) of impregnating solutions containing gelatin hydrolysate (GH) and CNF. ....	58
Figura 4 - Flow curves of cryoprotectant solutions: (a) before the impregnation process; (b) after the impregnation process .....	60

- Figura 5 - Freezing/thawing curves of potatoes impregnated with a solution with different concentrations of gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF).....62
- Figura 6 - Response surface for potato texture loss: (a) Storage without temperature fluctuation, (b) Storage with temperature fluctuation ..... 65
- Figura 7 - Micrographs of potatoes vacuum-impregnated with cellulose nanofibers and gelatin hydrolysate and free from pre-treatment stored under freezing: (a) without temperature fluctuation; (b) with temperature fluctuation. 200x magnification..... 66
- Figura 8 - Color analysis of potatoes impregnated with different concentrations of frozen and thawed gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF): (a) browning index (BI); (b) total color variation ( $\Delta E^*$ ). The bars represent mean values and the error bar corresponds to the standard deviation. Bars with the same letter for the same color parameters are not significantly different according to ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ). ..... 68

## Artigo 2

- Figura 1 - (a) Micrografia eletrônica de varredura com ampliação de 20000x das CNF; (b) Curva de calorimetria diferencial de varredura de congelamento ( $1\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ ) e fusão ( $1\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ ) da pasta de CNF; (c) MSCM e *surimi-like* de MSCM; (d) Curva de congelamento e descongelamento de *surimi-like* de MSCM com diferentes concentrações de crioprotetor. MSCM: carne de frango mecanicamente separa; CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores..... 93
- Figura 2 - Caracterização da oxidação das proteínas de *surimi-like* congelado: (a) Concentração de sulfidril, (b) Concentração de carbonila. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato; C2: controle negativo, isento de crioprotetores. As barras representam valores médios e as barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra maiúscula <sup>(A,B)</sup> entre os tratamentos em cada tempo, e

minúsculas <sup>(a,b)</sup>, para um mesmo tratamento no tempo, não diferem (p>0,05)...  
..... 97

Figura 3 - Caracterização das proteínas do *surimi-like* armazenado em diferentes tempos: (a) Gel de SDS-PAGE; (b) FTIR das proteínas; (c) Conteúdo de estrutura secundária. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.  
..... 99

Figura 4 - Perda de fluidos do *surimi-like* de frango por descongelamento. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores. As barras representam valores médios e as barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra maiúscula <sup>(A,B)</sup> entre os tratamentos em cada tempo, e minúsculas <sup>(a,b)</sup>, para um mesmo tratamento no tempo, não diferem (p>0,05)  
.....101

Figura 5 - Microestrutura de *surimi-like* adicionados com diferentes crioprotetores. Aumento de 500 x. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.....105

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Pesquisas que empregaram proteínas e peptídeos anticongelantes em alimentos .....	32
Tabela 2 - Pesquisas que empregaram hidrolisados e polifenóis anticongelantes em alimentos.....	33
Tabela 3 - Pesquisas que empregaram materiais nanométricos e polissacarídeos em alimentos.....	35

### SEGUNDA PARTE

#### Artigo 1

Tabela 1 - Central Compound Rotational Design (CCRD) variables .....	49
Tabela 2 - Thermal parameters of impregnating solutions containing different concentrations of gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF).....	59
Tabela 3 - Rheological parameters of impregnating solutions .....	61
Tabela 4 - Effects of GH and CNF impregnation on fluid loss and texture of thawed potato after freezing with and without temperature fluctuation .....	63
Tabela 5 - Effects of GH e CNF impregnation on the color and morphology of thawed potatoes after freezing .....	67

#### Artigo 2

Tabela 1 - Oxidação lipídica (índice de TBARS), teor de proteínas solúveis em sal e hidrofobicidade de <i>surimi-like</i> congelado .....	95
Tabela 2 – Propriedades de interação da água com o gel de <i>surimi-like</i> de frango .....	102
Tabela 3 - Propriedades texturais do gel de <i>surimi-like</i> de frango .....	103

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Água .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Congelamento de alimentos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1 Cristalização de gelo.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2 Recristalização de gelo .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Efeitos do congelamento em alimentos .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1 Congelamento de alimentos de origem vegetal .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.1.1 Batata.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2 Congelamento de alimentos de origem animal .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2.1 <i>Surimi</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Crioprotetores.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.1 Crioprotetores com propriedade de ligação ao gelo.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2 Crioprotetores com propriedade de estabilizar componentes.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.3 Crioprotetores com função dupla .....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>44</b>
<b>ARTIGO 1 - CRYOPROTECTIVE POTENTIAL OF CELLULOSE NANOFIBERS AND GELATIN HYDROLYSATE IN FROZEN POTATOES.....</b>	<b>44</b>
<b>ARTIGO 2 - APLICAÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE COMO CRIOPROTETOR NO ARMAZENAMENTO CONGELADO DE <i>SURIMI- LIKE</i> DE FRANGO.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>112</b>
<b>TERCEIRA PARTE.....</b>	<b>114</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. INTRODUÇÃO**

O congelamento é uma das técnicas mais eficiente e popular empregadas na conservação de alimentos. Com o congelamento o crescimento microbiológico, as reações químicas e reações metabólicas celulares são retardadas preservando o produto por um longo período (Fellows, 2009). Apesar de suas vantagens, esse método promove algumas alterações nos alimentos, pois a formação dos cristais de gelo pode ocasionar danos mecânicos na estrutura alimentar (Ordóñez-Pereda et al., 2005).

Após o descongelamento pode haver modificação na cor, sabor, valor nutricional e textura do alimento, devido ao amolecimento do tecido, aumento na perda de líquidos por gotejamento, redução na capacidade de retenção de água, escurecimento do tecido, perda de compostos solúveis em água, entre outros (Sun, 2011). Essas consequências indesejadas são mais evidentes quando é realizado um congelamento lento ou quando o produto é armazenado sob grandes flutuações de temperatura. Essas condições que favorecem a formação de grandes cristais de gelo intensificando a perda de qualidade dos alimentos congelados. Visando reduzir os impactos negativos ocasionado por essa operação unitária muitos estudos têm desenvolvido técnicas de congelamento inovadoras, bem como, aplicação de pré-tratamentos nos alimentos. Dentre os pré-tratamentos o emprego de crioprotetores tem sido estudado.

Os açúcares de baixo peso molecular possuem potencial crioprotetor, entretanto, eles atribuem aos produtos doçura e aumento calórico indesejados (Jenkelunas; li-chan, 2018; limpisophon et al., 2015). Outros agentes crioprotetores relatados em muitos trabalhos são as proteínas e peptídeos anticongelantes. Essas biomoléculas apresentam um mecanismo eficiente no controle do crescimento de cristais de gelo (He; Liu; Wang, 2018), porém possuem um alto custo devido ao seu processo de purificação. Já a aplicação de hidrolisados proteicos como agente crioprotetor é pouco investigada. Esses compostos, além de alto valor nutricional eles atuam estabilizando os componentes dos alimentos (Cheung; Liceaga; Li-Chan, 2009; Lin et al., 2019), sendo excelentes alvos para pesquisas. Os nanomateriais são outros crioprotetores em potencial. Estudos recentes têm mostrado que esses materiais apresentam dupla função sobre os alimentos congelados, pois controlam o crescimento dos cristais de gelo e estabilizam os componentes do produto (Meira et al., 2024; Tan et al., 2022; Zhu et al., 2021).

Dentre os hidrolisados proteicos, o hidrolisado de gelatina apresenta potencial de crioproteção, devido a presença de sequência tripeptídica de aminoácidos do tipo Gly-X-Y, que

atuam modificando o crescimento dos cristais de gelo (Damodaran, 2007). No grupo dos materiais nanométricos, as nanofibras de celulose têm se destacado graças a sua habilidade em minimizar o processo de recristalização de gelo, reduzindo os impactos estruturais nas matrizes alimentares (Li et al., 2019, 2020; Meira et al., 2024; ; Tan et al., 2022). Embora alguns trabalhos têm relatado a aplicação desses compostos como agentes crioprotetores sua aplicação em alimentos congelados ainda é pouco explorada. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial crioprotetor de hidrolisado de gelatina e nanofibras de celulose em batata congelada (artigo 1) e *surimi-like* de frango (artigo 2) por meio de análises de caracterização físico-química e microestrutural desses alimentos.

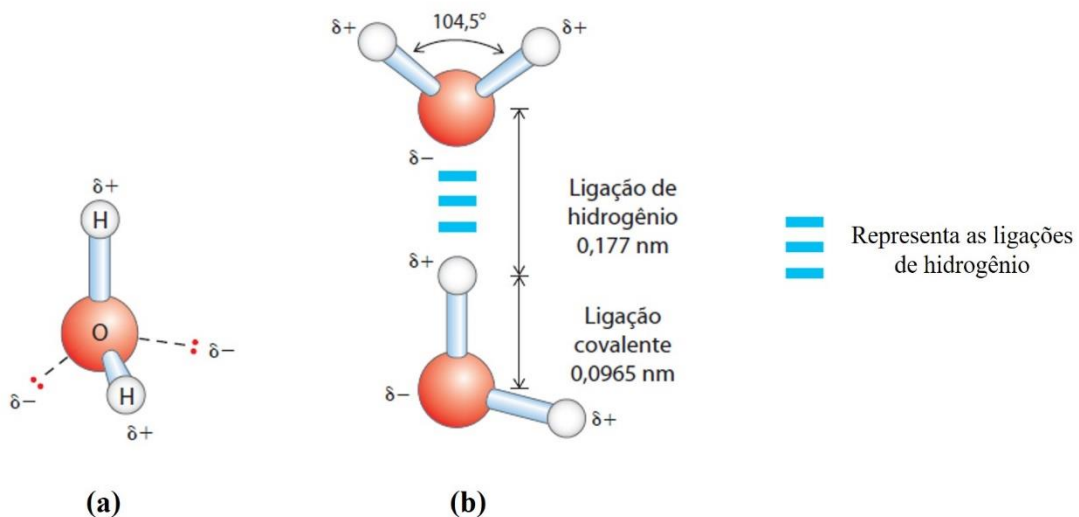
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Água

A água é uma substância abundante em nosso planeta. Ela é essencial para a vida, pois atua como meio onde ocorrem reações, no transporte de substâncias nutritivas e produtos de descarte, além de determinar reações com outras moléculas e promover a estabilização de biopolímeros. A água é o componente majoritário nos seres vivos e nos alimentos, compondo de 60 % a 70 % da composição da carne e 90 % a 95 % da estrutura dos vegetais (Ordóñez-Pereda et al., 2005).

Na molécula de água cada átomo de hidrogênio compartilha um par de elétrons com o átomo central de oxigênio de forma que os orbitais eletrônicos assumem formato de um tetraedro, onde o ângulo de ligação H-O-H é de  $104,5^\circ$ . Em dois vértices desse arranjo há átomos de hidrogênio e nos outros dois há pares de elétrons não compartilhados (Figura 1a). Devido a esta conformação, a água apresenta dipolos elétricos de forma que há interações eletrostáticas entre suas moléculas, como pode ser observado na Figura 1b (Nelson; Cox, 2014).

Figura 1 - Estrutura da molécula de água

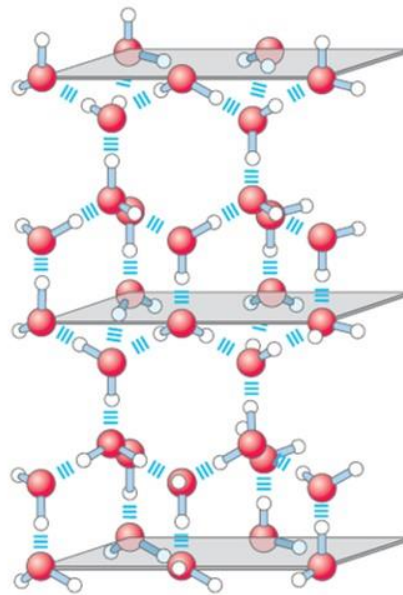


Fonte: Adaptado de Nelson; Cox (2014).

No estado líquido sob temperatura ambiente e pressão atmosférica as moléculas de água se apresentam desorganizadas e em movimento contínuo. Cada molécula de água forma em média ligações de hidrogênio com 3,4 moléculas próximas, enquanto que em estado sólido cada

molécula está fixa no espaço e forma ligações de hidrogênio com 4 outras moléculas de água formando uma estrutura de rede regular como ilustra a Figura 2 (Nelson; Cox, 2014). A conversão da água líquida em gelo gera um aumento de seu volume, nos alimentos o impacto dessa expansão vai depender do seu conteúdo de água. Essa variação de volume pode resultar em danos mecânicos nas células dos alimentos (Ordóñez-pereda et al., 2005), estruturas proteicas, emulsões, espumas, entre outros.

Figura 2 - Ligações de hidrogênio no gelo



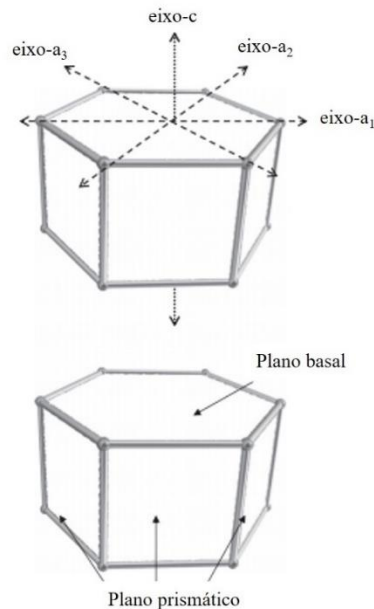
Fonte: Nelson; Cox (2014).

No gelo, sob pressão atmosférica e temperatura entre 0 e -60 °C, há uma organização cristalina estável das moléculas de água de forma que a estrutura assume conformação hexagonal, dando origem a um cristal orientado composto por três eixos simétricos (eixo  $a_1$ ,  $a_2$  e  $a_3$ ) e um eixo solitário (eixo  $c$ ) perpendicular a este plano. Como pode ser visto na Figura 3, o plano contendo os eixos “a” é chamado de plano basal e o plano contendo o eixo “c” é chamado de plano prismático (Wathen; Jia, 2005).

Em cada plano, o gelo cresce em uma taxa diferente. O crescimento na direção do plano prismático é mais rápido comparado ao crescimento na direção do plano basal de modo que se tem um crescimento anisotrópico (Hassas-Roudsari; Goff, 2012). A temperatura influencia diretamente nas taxas de crescimento desses planos, de forma que logo abaixo de 0 °C, os cristais possuem morfologia de disco circular e em temperaturas menores, morfologia de dendrítico (formato irregular) (Maruyama; Ashida; Knight, 1999). O tamanho dos cristais

também é influenciado pela taxa de resfriamento. Em taxas mais rápidas, há formação de um maior número de cristais de gelo com tamanhos reduzidos, já em taxas mais lentas, há formação de um menor número de cristais com tamanhos maiores (Fellows, 2006).

Figura 3 - Morfologia hipotética de um cristal de gelo



Fonte: Adaptado de Hassas-Roudsari; Goff (2012).

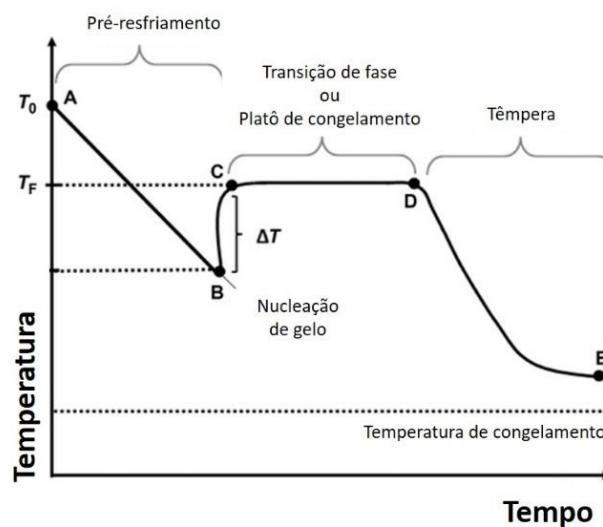
## 2.2 Congelamento de alimentos

O congelamento de alimentos é uma operação unitária que visa reduzir a temperatura do alimento abaixo de seu ponto de congelamento de forma que parte da água líquida cristalize em sua forma sólida (gelo). Esta técnica promove a preservação dos alimentos, pois ao imobilizar a água ocorre redução da atividade de água, diminuindo assim as mudanças bioquímicas, enzimáticas e a atividade microbiológica no produto (Fellows, 2009).

A conservação de alimentos por meio do congelamento é um dos métodos mais antigos, porém o domínio dessa tecnologia em épocas diferentes do período do inverno tem aproximadamente cinquenta anos (Sutariya; Sunkesula, 2021). Em 1880 com a criação do equipamento de refrigeração com amônia essa técnica pôde ser empregada na preservação comercial de alimentos (Powrie, 1984). Porém, o aumento do consumo de alimentos congelados ocorreu apenas nos anos de 1970-1990 quando os consumidores passaram a possuir freezer e forno micro-ondas em suas residências (Fellows, 2009).

O processo de congelamento é realizado em três etapas que englobam o pré-resfriamento, a transição de fase da água e a têmpera. A primeira etapa, descrita pelo trecho A e B da Figura 4, envolve a remoção do calor sensível do produto. Após atingir o ponto de início de congelamento o produto continua sendo resfriado já que a transição de fase não ocorre imediatamente. Neste estágio, o produto é super-resfriado. Em um determinado momento inicia-se a nucleação de gelo e ocorre um aumento rápido da temperatura do produto devido a liberação do calor latente (trecho B e C da Figura 4). Em seguida, no trecho C e D da Figura 4, ocorre a transição de fase também denominada de platô de congelamento. Nesta etapa, o calor latente de cristalização é retirado do produto e formam-se os cristais de gelo. Quanto maior a diferença entre as temperaturas de congelamento e nucleação mais rapidamente ocorre a formação dos cristais de gelo. Por fim, ocorre a terceira etapa descrita pelo trecho D e E da Figura 4. Neste momento, a maior parte da água já se solidificou e ocorre uma nova remoção do calor sensível até que o produto atinja a temperatura final de armazenamento (Otero et al., 2016; Otero; Sanz, 2006).

Figura 4 - Curva de congelamento típica



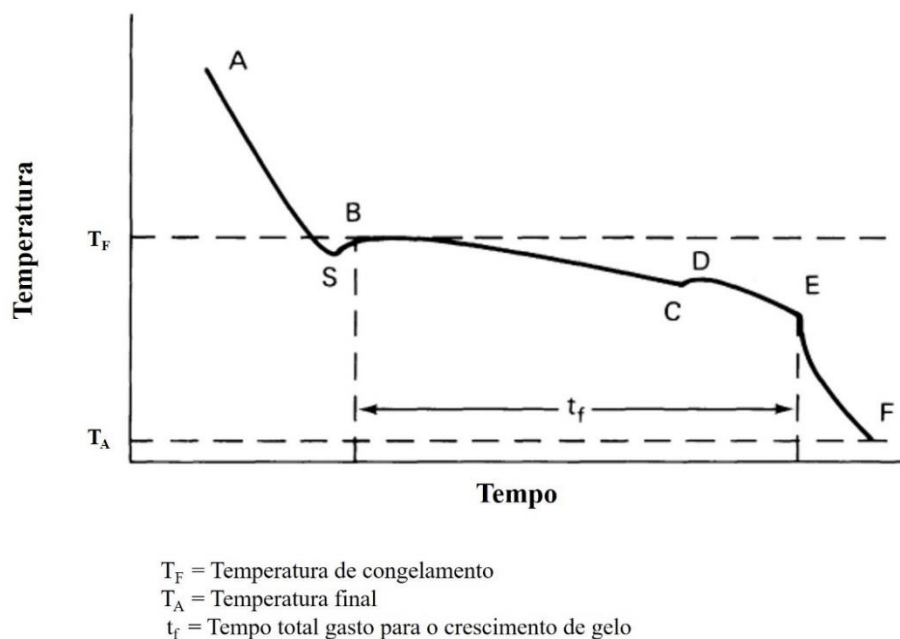
$T_0$  = temperatura inicial  
 $T_F$  = temperatura de congelamento  
 $T_N$  = temperatura de nucleação de gelo  
 $\Delta T$ , grau de super-resfriamento (diferença entre  $T_F$  e  $T_N$ )

Fonte: Adaptado de Otero et al. (2016).

Como os alimentos são matrizes complexas constituídas por água (solvente) e componentes biológicos (solutos), o congelamento não ocorre de forma uniforme. Em tecidos animais ou vegetais, por exemplo, a água está presente no espaço intracelular e extracelular. Como os fluidos extracelulares têm uma concentração mais baixa de solutos os primeiros cristais de gelo são formados nesta região (Fellows, 2009). Já durante o congelamento de

soluções, como polpas de frutas, por exemplo, ocorre a concentração progressiva da solução, devido ao congelamento, crescimento dos cristais de gelo e a exclusão do soluto pelo gelo. Desde modo, é formado sobre o gelo uma camada limite difusiva onde há um acúmulo de solutos originando uma camada de polarização da concentração que resulta em alteração do ponto de congelamento do produto (Vuist; Boom; Schutyser, 2020). Assim, a curva de congelamento de alimentos se difere da curva de congelamento típica apresentada na Figura 4. O congelamento de alimentos segue o perfil ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Curva de congelamento de alimentos



Fonte: Adaptado de Fellows (2009).

Pela Figura 5, nota-se que o congelamento ocorre em uma faixa de temperatura, porque à medida que uma parcela da água contida no alimento congela ocorre um aumento da concentração dos solutos na solução descongelada de forma que o ponto de congelamento é gradualmente diminuído (trecho B e C). No trecho C e D desta mesma figura pode-se observar um outro processo de liberação de calor latente, etapa que ocorre graças à cristalização de um dos solutos supersaturados presente na solução. A temperatura alcançada no ponto D é denominada temperatura eutética do soluto cristalizado (Fellows, 2009). Na temperatura eutética é atingido o máximo de solidificação para esse soluto (Fennema; Powrie; Marth, 1973).

Na Figura 5, ainda se percebe uma contínua cristalização da água e dos outros solutos remanescentes (trecho D e E) e um novo decréscimo da temperatura no trecho E e F, que ocorre devido à remoção do calor sensível até a temperatura final de armazenamento (ponto F).

### **2.2.1 Cristalização de gelo**

A cristalização de gelo é um processo físico-químico que envolve a nucleação e propagação dos cristais de gelo (Zhu et al., 2021). Na etapa de nucleação de gelo a água líquida se aglomera e assume o mesmo arranjo molecular que um cristal de gelo, formando um núcleo de gelo (Hew; Yang, 1992). Após a formação de um núcleo estável ocorre um deslocamento das demais moléculas de água para a superfície do núcleo (interface sólido-líquido) de forma que há o crescimento do cristal de gelo (Sun, 2011).

A cristalização é influenciada pela taxa de congelamento, temperatura final de armazenamento e nucleação. A taxa de congelamento e a temperatura final de armazenamento determinarão o tamanho, a distribuição e a quantidade de cristais de gelo (Regand; Goff, 2005). Em pequenas taxas de congelamento, ocorre a formação de grandes cristais de gelo, porque a água tem um maior grau de deslocamento em direção aos núcleos de gelo (Kiani; Sun, 2011) formando, assim, poucos cristais grandes.

A nucleação pode ocorrer de forma homogênea quando há uma orientação casual das moléculas de água, ou heterogênea, quando a formação de núcleo ocorre em torno de uma partícula suspensa ou em uma célula de apoio. Visto que os alimentos apresentam diversos solutos disperso na matriz, como carboidratos, sais, proteínas e outros há uma maior probabilidade de acontecer a nucleação heterogênea (Fellows, 2009). Essa nucleação de gelo sempre ocorre em uma temperatura maior que a nucleação homogênea (Hew; Yang, 1992).

Como mencionado anteriormente, a nucleação de gelo não ocorre no momento que o produto atinge a temperatura de congelamento. É necessário um super-resfriamento do produto para que a nucleação se inicie. Isto ocorre porque a formação de um minúsculo núcleo de gelo não é um processo favorável energeticamente, pois tende a aumentar a energia livre do sistema. Ao super-resfriar o produto, é possível formar um primeiro núcleo de gelo que, após atingir uma determinada dimensão (relação tamanho/volume crítica), promove diminuição da energia total do sistema e, conseqüentemente, a cristalização ocorre (Hew; Yang, 1992). Posteriormente a esse processo, ocorre a propagação dos cristais em todo o produto.

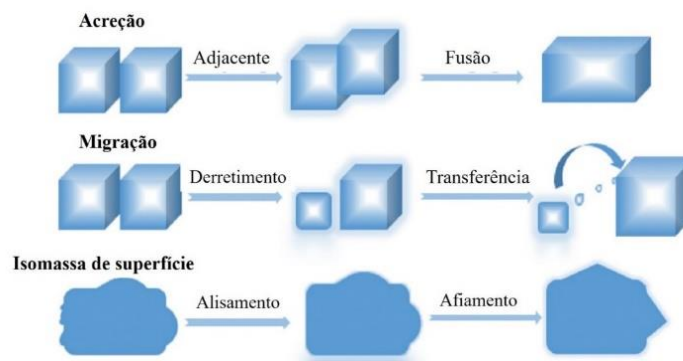
### **2.2.2 Recristalização de gelo**

Durante o armazenamento dos produtos congelados, pode ocorrer a recristalização de gelo. Neste processo, cristais de gelo maiores são formados em detrimento dos cristais de gelo menores (Griffith; Ewart, 1995). Esse fenômeno é termodinamicamente favorável, pois

promove a minimização da energia livre da superfície dos cristais pequenos (Zhu; Zhou; Sun, 2019). Esses pequenos cristais não ligam firmemente as moléculas de água em sua superfície graças à sua curvatura mais acentuada, gerando assim uma energia livre de superfície maior. Por isso as moléculas de água na superfície dos cristais pequenos tendem a migrar através da matriz para a superfície dos cristais maiores resultando no crescimento de cristais maiores e desaparecimento de cristais menores (Hagiwara; Hartel; Matsukawa, 2006).

A flutuação de temperatura no decorrer do armazenamento e o armazenamento prolongado sob temperatura constante promovem a recristalização de gelo nos produtos (Donhowe; Hartel, 1996). Os três tipos mais comuns desse fenômeno são: 1) a recristalização de isomassa, nesta há um arredondamento das bordas ou reorganização da estrutura interna da massa de gelo; 2) a recristalização de acreção, que promove uma coalescência física entre dois cristais próximos, resultando em um cristal maior; 3) a recristalização migratória, também chamada de maturação de Ostwald, onde há crescimento de grandes cristais à custa dos pequenos devido à diferença na temperatura de equilíbrio (Ndoye; Alvarez, 2015). Esses eventos são ilustrados na Figura 6.

Figura 6 - Três mecanismos de recristalização do gelo



Fonte: Adaptado de Zhu, Zhou e Sun (2019).

### 2.3 Efeitos do congelamento em alimentos

Os alimentos possuem um alto teor de água em sua composição de modo que durante seu armazenamento podem ocorrer reações químicas, bioquímicas e crescimento microbiológico. Visando preservar essas matrizes, diferentes formas de preservação podem ser empregadas. Entre as técnicas atualmente disponíveis, o congelamento é amplamente empregado (Li; Zhu; Sun, 2018). O congelamento permite conservar os alimentos frescos ou processados durante um período relativamente longo porque é uma técnica que imobiliza a água presente na matriz alimentar (Ordóñez-Pereda et al., 2005).

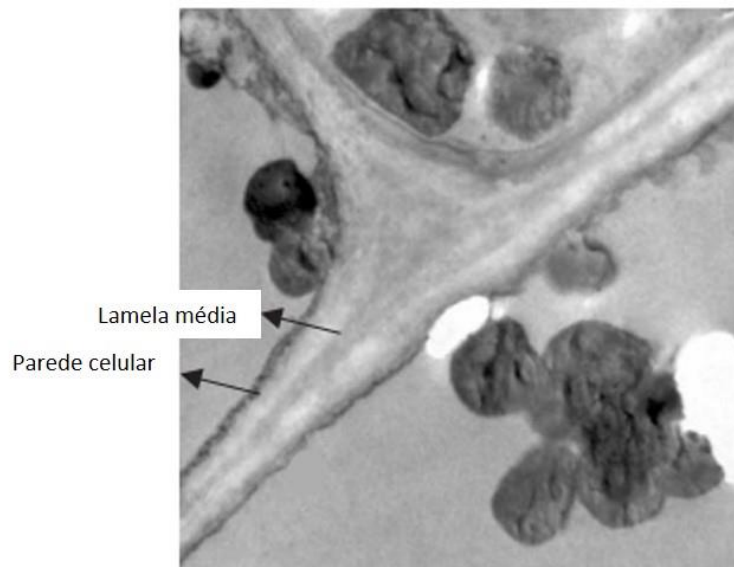
Embora haja vantagens o congelamento pode gerar alterações nas matrizes alimentares visto que a conversão de água em gelo pode trazer danos estruturais aos alimentos de origem vegetal e animal, resultando em gotejamento após o descongelamento, quebra de membranas com liberação de enzimas e aumento da concentração de solutos na fase descongelada (Powrie, 1984). Juntamente com as perdas estruturais, pode ocorrer algumas mudanças químicas que incluem a perda de solubilidade de proteínas, hidrólise e oxidação lipídica, degradação de pigmento natural, deterioração de vitaminas e formação de pigmento marrom (Fennema; Powrie; Marth, 1973).

As alterações nos alimentos dependem da natureza do alimento e das condições empregadas no congelamento. Assim, muitos estudos têm sido desenvolvidos objetivando obter alimentos congelados com menor perda de qualidade sensorial e nutricional (Cao et al., 2020; Meira et al., 2024; Tan et al., 2022; Wang et al., 2021).

### **2.3.1 Congelamento de alimentos de origem vegetal**

A formação dos cristais de gelo nos tecidos vegetais pode promover a quebra da estrutura celular e enfraquecimento da adesão intercelular gerando perda de turgor e amolecimento do tecido (Liang et al., 2015). Essas alterações indesejadas são acentuadas quando se aplica o congelamento lento. Durante este tipo de congelamento, ao reduzir a temperatura do produto, primeiramente a água extracelular se torna super-resfriada formando pequenos cristais de gelo entre as células vegetais (lamela média, Figura 7). Assim, visando estabelecer o equilíbrio osmótico, a água intracelular se move através da parede celular e contribui para o crescimento dos cristais de gelo extracelulares ocasionando o rompimento das paredes celulares (Powrie, 1984) e, conseqüentemente, ocorre alterações no produto.

Figura 7 - Eletromicrografia de transmissão da parede celular de fruto de goiabeira (10.000x)



Fonte: Natale, Prado e Môro (2005)

A textura de um alimento vegetal é influenciada diretamente pela parede celular e pelo conteúdo celular, o rompimento dessa estrutura gera perdas consideráveis deste atributo. Além disso, em frutas e vegetais frescos, um outro fator que influencia na textura é a pressão interna da célula viva (turgor). A manutenção dessa pressão somente é mantida quando a membrana celular está intacta. Quando a membrana celular é danificada devido à formação de cristais de gelo no congelamento, por exemplo, a água e as substâncias solúveis vazam da célula e a rigidez dos tecidos é perdida (Brown, 1977).

A força da parede celular e a adesão entre as células também impactam na textura e resistência dos vegetais. A hemicelulose e a pectina presentes na parede celular são responsáveis pela adesão intercelular (Ordaz-Ortiz; Marcus; Knox, 2009). A função desses polissacarídeos pode ser favorecida na presença de cálcio, pois este elemento atua auxiliando na reticulação das pectinas presentes na lamela média estabilizando, assim, as paredes celulares e contribuindo positivamente com o potencial de turgor celular (Sato; Sanjinéz-Argandoña; Cunha, 2006). Por isto muitos trabalhos empregam o cálcio em etapas de pré-tratamento de frutas congeladas, visando manter a qualidade dos produtos (Galletto et al., 2010; Reno; Prado; Resende, 2011; Sato; Sanjinéz-Argandoña; Cunha, 2006; Sirijariyawat; Charoenrein, 2013).

A textura dos tecidos vegetais ainda é influenciada pelo conteúdo de água presente em sua composição. Assim a perda desse fluido devido ao rompimento de estruturas celulares ou

migração durante o processo de congelamento deve ser evitada. Nos vegetais, a água se encontra nos vacúolos, citoplasma e no meio extracelular. A água presente no vacúolo contribui para a manutenção da firmeza do tecido. Se este compartimento for rompido esta água pode migrar para o citoplasma ou para a parede celular (Musse; Cambert; Mariette, 2010). A água no citoplasma está fracamente ligada às proteínas do citoesqueleto, enzimas ou outros componentes do citoplasma. Sua migração pode levar à perda de rigidez celular e funções celulares, gerando alterações nas propriedades mecânicas dos alimentos vegetais (Ragoonanan; Less; Aksan, 2013). Já a água extracelular se encontra entre as células, esta é a mais vulnerável ao congelamento (Li; Zhu; Sun, 2018).

### **2.3.1.1 Batata**

A batata, conhecida como *Solanum tuberosum*, é a quarta cultura mais importante na alimentação global (Ullah; Takhar; Sablani, 2014). Ela é consumida na forma de batatas fritas congeladas, caldos frescos, salgadinhos e como produto desidratado. Durante seu armazenamento prolongado, esse tubérculo fresco ou processado não deve ser conservado em altas temperaturas pois, apresenta grande perecibilidade e vulnerável a formação de pigmentos escuros, devido ao seu metabolismo ativo (Pinhero; Yada, 2016; Ullah; Takhar; Sablani, 2014). Uma forma de conservação e comercialização desse vegetal, é em formato de palitos congelados para fritar. Nesta configuração, sua venda tem ampliado, especialmente para o setor de serviços de alimentação (Kumar et al., 2018).

Além de muito apreciada e consumida em todo o mundo, a batata ainda apresentar uma estrutura homogênea que favorece sua aplicação em estudos sobre os efeitos de tecnologias inovadoras de congelamento em sua estrutura e em seus atributos físicos e sensoriais (Otero; Pozo, 2022), sendo, portanto, um vegetal indicado para utilizar em pesquisas.

### **2.3.2 Congelamento de alimentos de origem animal**

O congelamento de tecidos animais visa oferecer um produto com qualidade nutricional semelhante ao fresco e com maior tempo de vida útil. No entanto, pode haver mudanças no produto principalmente em relação à textura, cor, sabor, aparência e em relação à fração de água da carne (Leygonie; Britz; Hoffman, 2011). Esses efeitos são evidentes quando se emprega um congelamento lento e há um abuso da flutuação de temperatura durante o armazenamento desse produto, gerando o fenômeno de recristalização do gelo.

O crescimento de grande cristais de gelo pode causar a fragmentação das miofibrilas, das fibras musculares e do tecido conjuntivo em seu entorno, que posteriormente podem ser degradados por enzimas (Zhang et al., 2017). Tendo em vista que aproximadamente 85 % da água do tecido animal se encontra imobilizada dentro das miofibrilas, a fragmentação desta estrutura promove uma redução da capacidade de retenção da água (Honikel et al., 1986; Pearce et al., 2011) e redução do conteúdo de proteína solúvel da carne (Powrie, 1984). Os ácidos graxos livres no tecido animal também podem interagir com as proteínas musculares contribuindo com a redução da capacidade de retenção de água, além de desenvolver o sabor rançoso no alimento (Powrie, 1984).

Vale ressaltar que no congelamento as reações de oxidação são desaceleradas, mas não suprimidas (Huang et al., 2013). Os danos mecânicos na estrutura celular também favorecem o contato entre o oxigênio e as enzimas e substratos, contribuindo para a reação de oxidação nos produtos de origem animal (Ali et al., 2015). Também ocorre a liberação de pró-oxidantes encontrados dentro das células contribuindo para as reações químicas (Benjakul; Bauer, 2001).

Além de cortes cárneos congelados há diversos produtos cárneos processados congelados, dentre eles encontra-se o *surimi*. O *surimi* é composto de proteínas miofibrilares estabilizadas obtidas de carne de peixe desossada mecanicamente que é lavada, misturada com crioprotetor e congelada (Tina; Nurul; Ruzita, 2010). Como é imprescindível o processo de congelamento como forma de conservação desse produto, bem como a aplicação de crioprotetores, este alimento se torna um ótimo candidato para o estudo do efeito de novos crioprotetores em sua estrutura.

### **2.3.2.1 *Surimi***

O *surimi* é obtido por um longo processo que inclui o descabeçamento do peixe, seguida de sua evisceração, filetagem, desossa, lavagem, refino, desidratação, mistura com crioprotetores e congelamento. O número de ciclos de lavagem e o volume de água gasto variam de acordo com a espécie e frescura do peixe, estrutura da unidade de lavagem e a qualidade desejada do *surimi* (Park, 2014). A lavagem da pasta de carne permite aumentar seu tempo de armazenamento e resulta em um preparado proteico branco, insípido e inodoro (Galenko et al., 2020). Convencionalmente, a lavagem é realizada com água, porém sugerem a realização da lavagem também com soluções ácidas, básicas e salinas (Tina; Nurul; Ruzita, 2010). Após a lavagem, a massa é submetida a uma prensa de parafuso ou decantador para realizar o

desaguamento final e a redução do teor de umidade da carne. Por fim, são introduzidos na massa os crioprotetores e é realizado o congelamento do produto (Park, 2014).

Inicialmente, o *surimi* era produzido com o peixe Pollock do Alasca. Posteriormente, muitos outros peixes começaram a ser utilizados na elaboração deste produto e, atualmente, o *surimi* pode ser proveniente de outras espécies de animais. Quando o *surimi* é obtido de espécies de animais que não são peixes, o produto é denominado de *surimi-like*. O desenvolvimento deste *surimi* foi realizado graças à disponibilidade de carnes e subprodutos de baixo valor que poderiam ser incorporados na alimentação humana (Tina; Nurul; Ruzita, 2010). A literatura relata muitos trabalhos que produzem o *surimi-like* a partir de diferentes carnes, carnes mecanicamente separadas e vísceras comestíveis de diferentes espécies, como o *surimi-like* de carne de peru desossada mecanicamente (Massingue et al., 2019, 2022), *surimi-like* de carne mecanicamente separada de frango (Cortez-Vega et al., 2016; Cortez-Vega; Fonseca; Prentice, 2015; Cortez-Vega; Prentice, 2014; Wu et al., 2022), *surimi-like* de baço suíno (Toldrà et al., 2021), *surimi-like* de carne de foca (Shahidi; Synowiecki, 1993), *surimi-like* de carne de galinha (Nowsad et al., 2000), *surimi-like* de suíno (Jin et al., 2009; Park et al., 1996), *surimi-like* de bovino (Park et al., 1996) *surimi-like* de pato (Ramadhan; Huda; Ahmad, 2012a, 2014), *surimi-like* de coração bovino (Seo et al., 2016; Villalobos-Delgado et al., 2020), *surimi-like* de coração suíno (Villalobos-Delgado et al., 2020), *surimi-like* de carne de cabra (Chaijan; Srirattanachot; Panpipat, 2021), entre outros.

A elaboração de *surimi-like* é importante porque as carnes separadas mecanicamente, que são as principais matrizes utilizadas para elaboração do *surimi*, possuem alta susceptibilidade à oxidação lipídica, sabor intenso, coloração vermelha (do rosa ao vermelho escuro), propriedades texturais indesejadas e alta perecibilidade (Galenko et al., 2020; Pereira et al., 2011). Esse fato é atribuído à transição dos lipídios e hemoproteínas (proteínas com grupo heme) da medula óssea durante o processo de separação. Visando superar estas características indesejáveis o processamento dessa carne em produto tipo *surimi* é uma técnica que permite agregar valor a esta matéria-prima (Massingue et al., 2022). Isso ocorre, pois durante o processo de lavagem é feita a remoção da gordura e das proteínas sarcoplasmáticas (proteína solúvel em água, ou seja, hemoglobina/mioglobina, ácidos nucleicos, enzimas, entre outros) e a retenção das proteínas miofibrilares (proteínas solúvel em sal) (Wang et al., 2016). Assim, há um aumento da vida útil dessa proteína e maior viabilidade de sua aplicação posteriormente na fabricação de produtos cárneos como salsichas, mortadelas, hambúrgueres, linguiças e outros.

Durante o armazenamento congelado do *surimi-like*, devido ao crescimento dos cristais de gelo, pode ocorrer a oxidação das proteínas miofibrilares (Ramadhan; Huda; Ahmad,

2012b). Isto ocorre porque as proteínas se desdobram expondo os aminoácidos apolares que posteriormente formaram interações hidrofóbicas com outras regiões hidrofóbicas agregando as proteínas (Campo-Deaño et al., 2009). Também ocorre a oxidação dos grupos sulfidrilas formando ligações dissulfeto entre as proteínas e a carbonilação de cadeias laterais de aminoácidos (Wang et al., 2023). Para reduzir os impactos negativos do congelamento e a recristalização do gelo nas proteínas do *surimi*, é necessário inserido no produto agentes de criopreservação antes da etapa de congelamento, preservando assim sua habilidade em formar géis proteicos (Campo-Deaño et al., 2009).

## 2.4 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias que podem ser empregadas em produtos congelados para prevenir a perda de sua qualidade. Embora alguns aminoácidos, proteínas e polissacarídeos possam ser aplicados como agentes de criopreservação, a indústria comumente aplica açúcares de baixo peso molecular, como sacarose, polióis (sorbitol, lactitol, etc) e fosfatos (tripolifosfato de sódio, pirofosfato de sódio, fosfato trissódico e pirofosfato tetrassódico) para esta aplicação. Esses crioprotetores apresentam bom efeito crioprotetor e baixo custo, porém, alguns deles podem atribuir ao produto uma doçura indesejável (Jenkelunas; Li-Chan, 2018; Lin et al., 2019), podem comprometer a dieta dos consumidores que tem buscado cada vez mais a redução de calorias e ainda se tornam um risco para os consumidores que possuem diabetes (Limpisophon et al., 2015). Nesse sentido, o uso de crioprotetores alternativos e a misturas deles têm sido estudados visando aprimorar a estabilidade de alimentos congelados, sem comprometer as características sensoriais e nutricionais do produto.

Acredita-se que estes crioprotetores tradicionais amplamente usados na indústria, principalmente os açúcares, atuam sobre produtos cárneos prevenindo a desnaturação proteica e estabilizando as funções e propriedades estruturas das proteínas. Esta proteção ocorre devido às ligações ou associações dos crioprotetores com os grupos funcionais das proteínas por ligações iônicas ou de hidrogênio, de modo que cada molécula de proteína é revestida por crioprotetores formando um “complexo proteína-crioprotetor”. Assim, as moléculas de proteína são impedidas de entrar em contato uma com as outras e agregarem-se. Esse complexo ainda pode prevenir as perdas de moléculas de água localizadas entre as moléculas de proteína, reduzindo efeitos de exsudação dos tecidos (Matsumoto, 1980; Somjit et al., 2005; Walayat et al., 2020). Já em tecidos vegetais os açúcares atuam reduzindo o ponto de início de congelamento do produto e atuam interagindo com a água extracelular influenciando na

formação dos cristais de gelo (Zhu et al., 2021), minimizando o processo de recristalização do gelo e conseqüentemente os danos celulares intensos.

Diferentemente dos crioprotetores tradicionais há estudos que indicam a aplicação de outros crioprotetores inovadores. Segundo Zhu et al. (2021), os crioprotetores não convencionais podem ser classificados em três grupo. O primeiro grupo engloba crioprotetores com propriedades de ligação ao gelo. Estes são capazes de diminuir o ponto de congelamento do produto sem alterar o ponto de fusão de equilíbrio, gerando uma histerese térmica (ou seja, uma diferença entre estes pontos) ou atuam evitando a formação de cristais de gelo maiores em detrimento dos menores, impedindo a recristalização do gelo. O segundo grupo compreende os crioprotetores com habilidade de estabilizar componentes estruturais do produto, como os hidrolisados proteicos. Por fim, o terceiro grupo engloba os crioprotetores que atuam com as duas propriedades citadas anteriormente. Neste último grupo estão presentes os materiais em nanoescala.

Os crioprotetores podem ser inseridos no produto ao longo de sua fabricação adicionando-o no alimento como um ingrediente ou por impregnação a vácuo. A impregnação a vácuo é um processo de transferência de massa entre uma solução líquida e uma matriz alimentar sólida porosa impulsionada por um gradiente de pressão aplicado (Betoret et al., 2015). Nesse processo, o alimento poroso é inserido na solução líquida contendo o composto que se deseja impregnar, é aplicado vácuo por um determinado tempo, seguido pelo reestabelecimento da pressão atmosférica. Conseqüentemente, os espaços intracelulares são preenchidos pela solução externa e o composto é introduzido na matriz do alimento (Santarelli et al., 2021).

#### **2.4.1 Crioprotetores com propriedade de ligação ao gelo**

Os crioprotetores com propriedade de ligação ao gelo são as proteínas e peptídeos anticongelantes. As proteínas anticongelantes são formadas por um grupo de proteínas encontradas em organismos aclimatados ao frio que atuam protegendo estes seres contra os danos do congelamento (Zhu et al., 2021). Elas possuem atividade de histerese térmica e atuam inibindo o crescimento de cristais de gelo, retardando a recristalização causada pela flutuação de temperatura e modificando a morfologia dos cristais de gelo (Davies, 2014). Essas proteínas são encontradas naturalmente em algumas plantas, insetos, peixes, bactérias e fungos agindo como mecanismo de controle da formação de gelo, possibilitando assim a sobrevivência desses

organismos em temperaturas abaixo de zero (Ustun; Turhan, 2015). Acredita-se que o efeito de histerese térmica e inibição da recristalização são ocasionados devido à adsorção dessas proteínas à superfície do cristal de gelo crescente, promovendo uma microcurvatura da superfície do gelo de modo que há um aumento do gasto de energia para anexar água a esta superfície. Com isso, ocorre uma redução do ponto de congelamento do produto sem que haja alteração no ponto de fusão, desfavorecendo a formação de cristais maiores (He; Liu; Wang, 2018; Ustun; Turhan, 2015; Zhu et al., 2021).

Já os peptídeos anticongelantes de origem animal apresentam uma sequência tripeptídica de aminoácidos do tipo Gly-X-Y (por exemplo, glicina-prolina-hidroxiprolina), que permite a formação de um plano de tríade de oxigênio no terminal do peptídeo, com distâncias de oxigênio-oxigênio semelhantes aos núcleos de gelo, possibilitando a inibição eficiente do crescimento de cristais de gelo (Damodaran, 2007; Zhu et al., 2021). Esses peptídeos anticongelantes geralmente são derivados de colágeno ou gelatina. Assim, como as proteínas anticongelantes, sua ação provoca histerese térmica e inibição da recristalização (Zhu et al., 2021).

As proteínas e peptídeos anticongelantes têm sido estudados como agentes de criopreservação de alimentos. A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos que empregaram essas biomoléculas como alternativa para reduzir danos na matriz de alimentos congelados. Apesar dos avanços nas pesquisas, a aplicação dessas moléculas industrialmente ainda é limitada devido à dificuldade e ao alto custo atrelado ao processo de separação desses compostos.

Tabela 1 – Pesquisas que empregaram proteínas e peptídeos anticongelantes em alimentos

Crioprotetor	Produto de aplicação	Referências
Proteína de folhas de trigo de inverno aclimatado ao frio	Morango; Hambúrguer suíno	Velickova et al., 2013; Wang et al., 2021
Proteína de folhas de <i>Drimys angustifolia</i> aclimatado a frio	Carambola	Provesi et al., 2019
Concentrado proteico de cenoura	<i>Surimi</i> de peixe (bagre listrado)	Sharma et al., 2019
Peptídeo sintético	Cenoura	Kong et al., 2016
Peptídeo de hidrolisado de colágeno	Massa; <i>Surimi</i> de peixe (carpa prateada)	Cao et al., 2020; Chen et al., 2022; Yuan et al., 2022
Peptídeo sintético	Cereja; Massa	Kong et al., 2017; Lin et al., 2021
Peptídeo de hidrolisado de gelatina	Carne picada de peixe	Nikoo et al., 2015

Fonte: Do autor (2024).

#### 2.4.2 Crioprotetores com propriedade de estabilizar componentes

A aplicação de hidrolisados de proteínas como agente anticongelantes tem sido investigada graças às suas propriedades funcionais desejáveis, incluindo alta bioatividade e valor nutricional. O grau de sua hidrólise é um fator importante que influencia diretamente em sua ação (Zhu et al., 2021). Estudos têm mostrado que os hidrolisados proteicos de gelatina e ou colágeno tem atuado como agentes crioprotetores das proteínas actomiosina de bacalhau (Korzeniowska; Cheung; Li-Chan, 2013) , *surimi* (Limpisophon et al., 2015) e peixe picado (Cheung; Liceaga; Li-Chan, 2009). Estes, atuam retardando a exposição dos aminoácidos hidrofóbicos, a oxidação de sulfidrilas e se unem à miosina por ligação não covalente, de modo que há uma preservação das propriedades de gelificação e da capacidade de retenção de água das proteínas (Lin et al., 2019; Zhu et al., 2021). A aplicação desses hidrolisados em tecidos vegetais ainda é pouco explorada. Além disso, o emprego de hidrolisados proteicos provenientes de outras fontes também podem ser investigados.

Os polifenóis são uma outra classe de crioprotetores que atuam como antioxidantes protegendo o produto contra reações oxidativas por meio da eliminação de radicais livres da matriz (Huang et al., 2019). Esses compostos ainda agem fazendo ligações de hidrogênio com as proteínas auxiliando na estabilização delas e impedem reações bioquímicas desencadeadas por cofatores (Zhu et al., 2021). A Tabela 2 exibe alguns trabalhos que utilizaram hidrolisados proteicos ou polifenóis como agentes crioprotetores.

Tabela 2 - Pesquisas que empregaram hidrolisados e polifenóis anticongelantes em alimentos

Crioprotetor	Produto de aplicação	Referências
Hidrolisado de pescada do Pacífico	Filé de bacalhau; Carne picada de peixe	Cheung; Liceaga; Li-Chan, 2009; Jenkelunas; Li-Chan, 2018
Hidrolisado da proteína branquial da carpa cabeça-dura	<i>Surimi</i>	Lin et al., 2019
Hidrolisado de proteína de grão de bico	<i>Surimi</i>	Wang et al., 2023
Hidrolisado de gelatina e nanofibras de celulose	Batata	Meira et al., 2024
Polifenóis: ácido carnósico, procianidina, quercetina, resveratrol, ácido clorogênico e galato de epigallocatequina	Filé de tilápia	Wei et al., 2021

Fonte: Do autor (2024).

### 2.4.3 Crioprotetores com função dupla

Os crioprotetores de função dupla atuam inibindo a formação de gelo durante a recristalização e estabilizando componentes do produto (Zhu et al., 2021). Este grupo compreende os polissacarídeos e os nanomateriais. O mecanismo de ação dos polissacarídeos ainda não é claro, mas acredita-se que eles evitam a recristalização do gelo graças ao seu efeito gelificante, visto que durante esse processo, há uma restrição da mobilidade da água e crescimento dos cristais, além de modificações da morfologia do gelo (Gaukel; Leiter; Spiess, 2014). Os polissacarídeos ainda atuam estabilizando a estrutura das proteínas contra o

congelamento, pois realizam ligações de hidrogênio entre seus grupos hidroxilas e as hidroxilas residuais das proteínas (Zhu et al., 2021), evitando assim a desnaturação, oxidação e agregação de proteínas (Zhang et al., 2020).

Já os materiais nanométricos provavelmente atuam inibindo a nucleação de gelo devido a aumento da barreira de energia livre quando seu tamanho é menor que a dimensão crítica do núcleo de gelo (Zhu et al., 2021). Assim, o ponto de congelamento é reduzido e ocorre a histerese térmica. O inverso também pode ser observado quando o tamanho desses materiais varia de 10 a 1000 Å pode ocorrer a indução da nucleação do gelo (Welti; Stetzer; Lohmann, 2009). Além disso, devido à sua dimensão os materiais em nanoescala podem penetrar nos tecidos e quelar íon metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  presentes em produtos de origem animal, por exemplo, de forma que a agregação de proteínas induzida por estes íons e a oxidação lipídica sejam inibidas (Zhu et al., 2021).

Por se tratar de um mecanismo novo para a crioproteção, pesquisadores têm explorado esses materiais nanométricos. Alguns trabalhos tem relatado a aplicação de malhas de prata no controle da recristalização de gelo (Wu et al., 2017), de nanocelulose como potencial inibidor de recristalização do gelo (Li et al., 2019, 2020; Meira et al., 2024), de nanocompositos de quitosana em lagostim como agente que reduz danos estruturais e a perda da capacidade de retenção de água (Sun et al., 2019), de nanopartículas de quitosana em camarões como agente retardante da oxidação lipídica e danos celulares (Chouljenko et al., 2017; Solval et al., 2014) e aplicação de nanopartículas de quitosana e óxido de ferro juntamente com proteínas anticongelante em carne de arenque (Nian et al., 2019).

Outras aplicações de crioprotetores de função dupla podem ser vistas na Tabela 3.

Tabela 3 - Pesquisas que empregaram materiais nanométricos e polissacarídeos em alimentos

Origem do crioprotetor	Produto de aplicação	Referências
Nanocelulose	Soluções de sacarose e salinas	Li et al., 2019, 2020
Nanocelulose	<i>Lactobacillus plantarum</i> liofilizado	Nahr et al., 2015
Nanofibras de celulose carboxilada	Filé de corvina	Tan et al., 2022
Nanopartículas de quitosana	Camarão	Chouljenko et al., 2017; Solval et al., 2014
Nanopartículas de quitosana	<i>Surimi</i> de peixe	Hajji et al., 2019
Polissacarídeo oligo-glucomanano Konjac	<i>Surimi</i> de peixe (carpa prateada)	Walayat et al., 2022a
Oligossacarídeo de carragenina e xilooligossacarídeo	Camarão	Zhang et al., 2020
Polissacarídeo Kappa-carragenina	<i>Surimi</i> de peixe (carpa capim)	Walayat et al., 2022b
Polissacarídeo carboximetil quitosano	<i>Surimi</i> de peixe (carpas prateadas)	Zhu et al., 2022
Xilooligossacarídeo	Carne suína	Carvalho et al., 2023

Fonte: Do autor (2024).

## REFERÊNCIAS

- ALI, S. et al. Effect of multiple freeze-thaw cycles on the quality of chicken breast meat. **Food Chemistry**, v. 173, p. 808–814, 2015.
- BENJAKUL, S.; BAUER, F. Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis* Linne) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 207–217, 2001.
- BETORET, E. et al. Strategies to improve food functionality: Structure-property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 1–12, 2015.
- BROWN, M. S. Texture of frozen fruits and vegetables. **Journal of texture studies**, v. 7, n. 6, p. 391–404, 1977.
- CAMPO-DEAÑO, L. et al. Rheological study of giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) made by two methods with different cryoprotectants added. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 1, p. 26–33, 2009.
- CAO, H. et al. Cryo-protective effect of ice-binding peptides derived from collagen

- hydrolysates on the frozen dough and its ice-binding mechanisms. **Lwt**, v. 131, n. May, p. 109678, 2020.
- CARVALHO, M. F. F. DE et al. Performance de xilooligossacarídeo como agente crioprotetor em carne suína por impregnação a vácuo. **Revista Perspectiva**, v. 47, n. 179, p. 101–115, 2023.
- CHAIJAN, M.; SRIRATTANACHOT, K.; PANPIPAT, W. Biochemical property and gel-forming ability of surimi-like material from goat meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 988–998, 2021.
- CHEN, X. et al. Investigation of the cryoprotective mechanism and effect on quality characteristics of surimi during freezing storage by antifreeze peptides. **Food Chemistry**, v. 371, n. September 2021, p. 131054, 2022.
- CHEUNG, I. W. Y.; LICEAGA, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Pacific hake (*merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotective agents in frozen pacific cod fillet mince. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 8, p. 588–594, 2009.
- CHOULJENKO, A. et al. Effects of vacuum tumbling with chitosan nanoparticles on the quality characteristics of cryogenically frozen shrimp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 114–123, 2017.
- CORTEZ-VEGA, W. et al. Effect of washing cycles on the quality of surimi-like material obtained from mechanically deboned chicken meat. **Acta Alimentaria**, v. 46, n. 2, p. 172–180, 2016.
- CORTEZ-VEGA, W. R.; FONSECA, G. G.; PRENTICE, C. Optimization of parameters for obtaining surimi-like material from mechanically separated chicken meat using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 763–772, 2015.
- CORTEZ-VEGA, W. R.; PRENTICE, S. P. C. Nutritional quality evaluation of surimi and kamaboko obtained from mechanically separated chicken meat. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 1, p. 483–491, 2014.
- DAMODARAN, S. Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10918–10923, 2007.
- DAVIES, P. L. Ice-binding proteins: A remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 11, p. 548–555, 2014.
- DONHOWE, D. P.; HARTEL, R. W. Recrystallization of ice in ice cream during controlled accelerated storage. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 11–12, p. 1191–1208, 1996.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- FELLOWS, P. J. Freezing. In: **Food Processing Technology**. 3. ed. Sawston: Woodhead publishing, 2009. p. 650–686.
- FENNEMA, O. .; POWRIE, W. D. .; MARTH, E. H. **Low Temperature Preservation of**

**Foods and Living Matter**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1973.

GALENKO, O. et al. Impact of washing solutions on chemical composition and physico-chemical properties of surimi-like mechanically deboned turkey meat \*. v. XIX, n. 2, p. 170–175, 2020.

GALETTO, C. D. et al. Freezing of strawberries by immersion in CaCl<sub>2</sub> solutions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 243–248, 2010.

GAUKEL, V.; LEITER, A.; SPIESS, W. E. L. Synergism of different fish antifreeze proteins and hydrocolloids on recrystallization inhibition of ice in sucrose solutions. **Journal of Food Engineering**, v. 141, p. 44–50, 2014.

GRIFFITH, M.; EWART, K. V. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 375–402, 1995.

HAGIWARA, T.; HARTEL, R. W.; MATSUKAWA, S. Relationship between recrystallization rate of ice crystals in sugar solutions and water mobility in freeze-concentrated matrix. **Food Biophysics**, v. 1, n. 2, p. 74–82, 2006.

HAJJI, S. et al. Suitability of chitosan nanoparticles as cryoprotectant on shelf life of restructured fish surimi during chilled storage. **Cellulose**, v. 26, n. 11, p. 6825–6847, 2019.

HASSAS-ROUDSARI, M.; GOFF, H. D. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 425–436, 2012.

HE, Z.; LIU, K.; WANG, J. Bioinspired Materials for Controlling Ice Nucleation, Growth, and Recrystallization. **Accounts of Chemical Research**, v. 51, n. 5, p. 1082–1091, 2018.

HEW, C. L.; YANG, D. S. C. Protein interaction with ice. **European Journal of Biochemistry**, v. 203, n. 1–2, p. 33–42, 1992.

HONIKEL, K. O. et al. Sarcomere shortening of prerigor muscles and its influence on drip loss. **Meat Science**, v. 16, n. 4, p. 267–282, 1986.

HUANG, L. et al. Influence of storage temperature and duration on lipid and protein oxidation and flavour changes in frozen pork dumpling filler. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 295–301, 2013.

HUANG, L. et al. Textural and sensorial quality protection in frozen dumplings through the inhibition of lipid and protein oxidation with clove and rosemary extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 10, p. 4739–4747, 2019.

JENKELUNAS, P. J.; LI-CHAN, E. C. Y. Production and assessment of Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotectants for frozen fish mince. **Food Chemistry**, v. 239, p. 535–543, 2018.

JIN, S.-K. et al. Effects of number of washes and pH adjustment on characteristics of surimi-like materials from pork leg muscle. **Asian -Australasian Journal of Animal**, v. 22, p. 584–590, 2009.

KIANI, H.; SUN, D. W. Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review.

**Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 407–426, 2011.

KONG, C. H. Z. et al. Effect of antifreeze peptide pretreatment on ice crystal size, drip loss, texture, and volatile compounds of frozen carrots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 21, p. 4327–4335, 2016.

KONG, C. H. Z. et al. Antifreeze peptide pretreatment minimizes freeze-thaw damage to cherries: An in-depth investigation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 441–448, 2017.

KORZENIOWSKA, M.; CHEUNG, I. W. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. Effects of fish protein hydrolysate and freeze-thaw treatment on physicochemical and gel properties of natural actomyosin from Pacific cod. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1967–1975, 2013.

LEYGONIE, C.; BRITZ, T. J.; HOFFMAN, L. C. Oxidative stability of previously frozen ostrich *Muscularis iliofibularis* packaged under different modified atmospheric conditions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 1171–1178, 2011.

LI, D.; ZHU, Z.; SUN, D. W. Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 75, n. March, p. 46–55, 2018.

LI, T. et al. Inhibiting Ice Recrystallization by Nanocelluloses. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 4, p. 1667–1674, 2019.

LI, T. et al. Effect of surface charge density on the ice recrystallization inhibition activity of nanocelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 234, n. October 2019, p. 115863, 2020.

LIANG, D. et al. Advantages of immersion freezing for quality preservation of litchi fruit during frozen storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 948–956, 2015.

LIMPISOPHON, K. et al. Cryoprotective effect of gelatin hydrolysate from shark skin on denaturation of frozen surimi compared with that from bovine skin. **Fisheries Science**, v. 81, n. 2, p. 383–392, 2015.

LIN, J. et al. Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in preventing denaturation of frozen surimi. **Food Chemistry**, v. 298, n. May, p. 124868, 2019.

MARUYAMA, M.; ASHIDA, T.; KNIGHT, C. A. Disk crystals of ice grown in air-free water: no effect of dissolved air on the morphology. **Journal of Crystal Growth**, v. 205, n. 3, p. 391–394, 1999.

MASSINGUE, A. A. et al. Effect of washing cycles and solutions on chemical composition and physicochemical properties of the surimi-like material from mechanically deboned turkey meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 5, p. 1–11, 2019.

MASSINGUE, A. A. et al. Effect of incorporating surimi-like material from mechanically deboned turkey meat on physicochemical and sensory characteristics of ready-to-eat broiler breast meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 5, p. 1–11, 2022.

- MATSUMOTO, J. J. Chemical Deterioration of Muscle Proteins During Frozen Storage. In: **Chemical Deterioration of Proteins**. 1. ed. [s.l.] American Dairy Science Association, 1980. p. 95–124.
- MEIRA, A. C. F. DE O. et al. Cryoprotective Potential of Cellulose Nanofibers and Gelatin Hydrolysate in Frozen Potatoes. **Food and Bioprocess Technology**, n. 0123456789, 2024.
- MUSSE, M.; CAMBERT, M.; MARIETTE, F. NMR study of water distribution inside tomato cells: Effects of water stress. **Applied Magnetic Resonance**, v. 38, n. 4, p. 455–469, 2010.
- NAHR, F. K. et al. Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. **Lwt**, v. 64, n. 1, p. 326–332, 2015.
- NATALE, W.; PRADO, R. DE M.; MÔRO, F. V. Alterações anatômicas induzidas pelo cálcio na parede celular de frutos de goiabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 1239–1242, 2005.
- NDOYE, F. T.; ALVAREZ, G. Characterization of ice recrystallization in ice cream during storage using the focused beam reflectance measurement. **Journal of Food Engineering**, v. 148, p. 24–34, 2015.
- NELSON, D. L. .; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NIAN, L. et al. Effect of vacuum impregnation of red sea bream (*Pagrosomus major*) with herring AFP combined with CS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles during freeze-thaw cycles. **Food Chemistry**, v. 291, n. November 2018, p. 139–148, 2019.
- NIKOO, M. et al. Study of the combined effects of a gelatin-derived cryoprotective peptide and a non-peptide antioxidant in a fish mince model system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 358–364, 2015.
- NOWSAD, A. A. et al. Washing and cryoprotectant effects on frozen storage of spent hen surimi. **Poultry Science**, v. 79, n. 6, p. 913–920, 2000.
- ORDAZ-ORTIZ, J. J.; MARCUS, S. E.; KNOX, J. P. Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. **Molecular Plant**, v. 2, n. 5, p. 910–921, 2009.
- ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A. . et al. **Tecnología de alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- OTERO, L. et al. Effects of Magnetic Fields on Freezing: Application to Biological Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 646–667, 2016.
- OTERO, L.; POZO, A. Effects of the application of static magnetic fields during potato freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 316, p. 110838, 2022.

OTERO, L.; SANZ, P. D. High-pressure-shift freezing: Main factors implied in the phase transition time. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 4, p. 354–363, 2006.

PARK, J. A. E. W. **Surimi and surimi seafood**. 3. ed. New York: CRC Press, 2014.

PARK, S. et al. Process and characteristics for a surimi-like material made from beef or pork. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 2, p. 422–427, 1996.

PEARCE, K. L. et al. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review. **Meat Science**, v. 89, n. 2, p. 111–124, 2011.

PEREIRA, A. G. T. et al. Effects of the addition of mechanically deboned poultry meat and collagen fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. **Meat Science**, v. 89, n. 4, p. 519–525, 2011.

PINHERO, R. G.; YADA, R. Y. **Postharvest Storage of Potatoes**. Second Edition ed. 2 Elsevier Inc., 2016.

POWRIE, W. D. Chemical effects during storage of frozen foods. **Journal of Chemical Education**, v. 61, n. 4, p. 340–347, 1984.

PROVESI, J. G. et al. Extraction of antifreeze proteins from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* and their application to star fruit (*Averrhoa carambola*) freezing. **Food Chemistry**, v. 289, n. March, p. 65–73, 2019.

RAGOONANAN, V.; LESS, R.; AKSAN, A. Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. Part 2: The link between the state of the membrane-cytoskeleton complex and the cellular damage. **Cryobiology**, v. 66, n. 2, p. 96–104, 2013.

RAMADHAN, K.; HUDA, N.; AHMAD, R. Physicochemical and sensory characteristics of burger made from duck surimi-like material. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2316–2323, 2012a.

RAMADHAN, K.; HUDA, N.; AHMAD, R. Freeze-thaw stability of duck surimi-like materials with different cryoprotectants added. **Poultry Science**, v. 91, n. 7, p. 1703–1708, 2012b.

RAMADHAN, K.; HUDA, N.; AHMAD, R. Effect of number and washing solutions on functional properties of surimi-like material from duck meat. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 256–266, 2014.

RENO, M. J.; PRADO, M. E. T.; RESENDE, J. V. DE. Microstructural changes of frozen strawberries submitted to pre-treatments with additives and vacuum impregnation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 247–256, 2011.

SANTARELLI, V. et al. Combined Use of Blanching and Vacuum Impregnation with Trehalose and Green Tea Extract as Pre-treatment to Improve the Quality and Stability of Frozen Carrots. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 7, p. 1326–1340, 2021.

SATO, A. C. K.; SANJINÉZ-ARGANDOÑA, E. J.; CUNHA, R. L. The effect of addition of

calcium and processing temperature on the quality of guava in syrup. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 417–424, 2006.

SEO, J. K. et al. Properties of frankfurter-type sausages with pork back-fat replaced with bovine heart surimi-like materials. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 4, p. 523–530, 2016.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Nutrient composition of mechanically separated and surimi-like seal meat. **Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 41–46, 1993.

SHARMA, S. et al. Effects of Partial and Complete Replacement of Synthetic Cryoprotectant with Carrot (*Daucus carota*) Concentrated Protein on Stability of Frozen Surimi. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 28, n. 8, p. 808–820, 2019.

SIRIJARIYAWAT, A.; CHAROENREIN, S. Texture and pectin content of four frozen fruits treated with calcium. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 1346–1355, 2013.

SOLVAL, K. M. et al. Evaluation of chitosan nanoparticles as a glazing material for cryogenically frozen shrimp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 172–180, 2014.

SOMJIT, K. et al. The cryoprotectant effect of shrimp chitin and shrimp chitin hydrolysate on denaturation and unfrozen water of lizardfish surimi during frozen storage. **Food Research International**, v. 38, n. 4, p. 345–355, 2005.

SUN, D.-W. **Handbook of frozen food processing and packaging**. 2. ed. Florida, USA: CRC Press/Taylor & Francis, 2011.

SUN, Y. et al. Ultrasound treatment of frozen crayfish with chitosan Nano-composite water-retaining agent: Influence on cryopreservation and storage qualities. **Food Research International**, v. 126, n. September, 2019.

SUTARIYA, S. G.; SUNKESULA, V. Food Freezing: Emerging Techniques for Improving Quality and Process Efficiency a Comprehensive Review. In: **Innovative Food Processing Technologies**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 36–63.

TAN, M. et al. The quality properties of frozen large yellow croaker fillets during temperature fluctuation cycles: improvement by cellobiose and carboxylated cellulose nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 194, n. November 2021, p. 499–509, 2022.

TINA, N.; NURUL, H.; RUZITA, A. Surimi-like material: Challenges and prospects. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 3, p. 509–517, 2010.

TOLDRÀ, M. et al. Surimi-like protein ingredient from porcine spleen as lean meat replacer in emulsion-type sausages. **Meat Science**, v. 182, 2021.

ULLAH, J.; TAKHAR, P. S.; SABLANI, S. S. Effect of temperature fluctuations on ice-crystal growth in frozen potatoes during storage. **Lwt**, v. 59, n. 2P1, p. 1186–1190, 2014.

USTUN, N. S.; TURHAN, S. Antifreeze Proteins: Characteristics, Function, Mechanism of Action, Sources and Application to Foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 3189–3197, 2015.

VELICKOVA, E. et al. Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 146–150, 2013.

VILLALOBOS-DELGADO, L. H. et al. Quality of cooked sausages with added beef or pork heart surimi. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 12, 2020.

WALAYAT, N. et al. Role of Cryoprotectants in Surimi and Factors Affecting Surimi Gel Properties: A Review. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–20, 2020.

WALAYAT, N. et al. Influence of Konjac oligo-glucomannan as cryoprotectant on physicochemical and structural properties of silver carp surimi during fluctuated frozen storage. **Lwt**, v. 164, n. March, p. 113641, 2022a.

WALAYAT, N. et al. Kappa-carrageenan as an effective cryoprotectant on water mobility and functional properties of grass carp myofibrillar protein gel during frozen storage. **Lwt**, v. 154, p. 112675, 2022b.

WANG, B. et al. Effect of ice structuring protein on the quality of quick-frozen patties subjected to multiple freeze-thaw cycles. **Meat Science**, v. 172, n. May 2020, p. 108335, 2021.

WANG, C. et al. Chickpea protein hydrolysate as a novel plant-based cryoprotectant in frozen surimi: Insights into protein structure integrity and gelling behaviors. **Food Research International**, v. 169, n. April, p. 112871, 2023.

WANG, H. L. et al. Chicken surimi fortified by omega-3 fatty acid addition: Manufacturing and quality properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 5, p. 1609–1617, 2016.

WATHEN, B.; JIA, Z. Controlling the freezing process with antifreeze proteins. In: **Emerging Technologies for Food Processing**. Ontario: Elsevier Ltd, 2005. p. 653–674.

WEI, P. et al. The inhibition mechanism of the texture deterioration of tilapia fillets during partial freezing after treatment with polyphenols. **Food Chemistry**, v. 335, n. January 2020, p. 127647, 2021.

WELTI, A.; STETZER, O.; LOHMANN, U. Atmospheric Chemistry and Physics Influence of particle size on the ice nucleating ability of mineral dusts. **Atmos. Chem. Phys**, v. 9, p. 6705–6715, 2009.

WU, S. et al. Size Controllable, Transparent, and Flexible 2D Silver Meshes Using Recrystallized Ice Crystals as Templates. **ACS Nano**, v. 11, n. 10, p. 9898–9905, 2017.

WU, Y. H. S. et al. Effects of washing step and salt-addition levels on textural and quality properties in the chicken-surimi products. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, p. 101885, 2022.

YUAN, C. et al. Cryoprotective effect of low molecular weight collagen peptides on myofibrillar protein stability and gel properties of frozen silver carp surimi. **Journal of Food Measurement and Characterization**, n. 0123456789, 2022.

ZHANG, B. et al. Influence of temperature fluctuations on growth and recrystallization of ice crystals in frozen peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pre-soaked with carrageenan oligosaccharide and xylooligosaccharide. **Food Chemistry**, v. 306, n. 1, p. 125641, 2020.

ZHANG, M. et al. Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles. **Meat Science**, v. 133, n. January, p. 10–18, 2017.

ZHU, S. et al. Dual cryoprotective strategies for ice-binding and stabilizing of frozen seafood: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, n. August 2020, p. 223–232, 2021.

ZHU, X. et al. Cryoprotective Roles of Carboxymethyl Chitosan during the Frozen Storage of Surimi: Protein Structures, Gel Behaviors and Edible Qualities. **Foods**, v. 11, n. 3, 2022.

ZHU; ZHOU, Q.; SUN, D. W. Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments. **Trends in Food Science and Technology**, v. 90, n. April, p. 13–25, 2019.

**SEGUNDA PARTE****ARTIGO 1****CRYOPROTECTIVE POTENTIAL OF CELLULOSE NANOFIBERS AND GELATIN  
HYDROLYSATE IN FROZEN POTATOES**

Normas do periódico: Food and Bioprocess Technology

(versão publicada)

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03360-w>

Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira<sup>a</sup>, Larissa Carolina de Moraes<sup>a</sup>, Carine Setter<sup>b</sup>, Lizzy  
Ayra Alcântara Veríssimo<sup>a</sup>, Carlos Wanderlei Piler Carvalho<sup>c</sup>, Jaime Vilela de Resende<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brazil.*

<sup>b</sup>*Federal University of Lavras, Department of Engineering, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brazil.*

<sup>c</sup>*Embrapa Food Technology, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 23020-470, Brazil.*

\*Correspondence to: Jaime Vilela de Resende, Department of Food Science, Federal  
University of Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brazil, (E-mail:  
[jvresende@ufla.com.br](mailto:jvresende@ufla.com.br))

## ABSTRACT

In this study, the combined effect of gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF) on the quality parameters of frozen potatoes with and without temperature fluctuation was evaluated. Potatoes were cut, blanched, impregnated with different concentrations of GH (0.08 to 4.32 % w/w) and CNF (0.08 to 4.32 % w/w) combined in a central composite rotational design and frozen with and without temperature fluctuation. Bleached samples without impregnation were used as controls. Electrophoresis and FTIR analyzes indicated the presence of polypeptides in the gelatin hydrolysate and electron microscopy indicated that cellulose nanofibers have nanometric diameters (20 to 90 nm), these characteristics influence the freezing of water. The solution containing 2.20 % w/w GH and 2.20 % w/w CNF showed a lower freezable water content by DSC analysis ( $92.49 \pm 0.42$  %), indicating greater interaction of the compounds with water in this condition. When impregnated in potato cuts, this solution promoted lower losses of fluid ( $19.06 \pm 0.51$  % and  $28.71 \pm 0.21$  %, respectively) and texture ( $23.30 \pm 0.54$  % and  $41.95 \pm 0.55$  %, respectively) when subjected to storage without and with temperature fluctuations, thus delaying the recrystallization of the ice. Furthermore, smaller losses in the microstructure and color of the plant tissue were observed when using this treatment. A reduction in the freezing temperature of the impregnated samples was also observed (temperatures lower than the control  $-0.615$  °C). The results indicated that GH and CNF have effective cryopreservation potential.

**Keywords:** Hydrocolloid impregnation; Antifreeze peptides; Frozen tuber; Ice crystal growth inhibition; Nanomaterials; Cryopreservation.

## 1. INTRODUCTION

Freezing is an effective method for preserving vegetables and fruits for a long period, but the cellular damage caused by this technique remains a challenge for the industry (Jha et al. 2020). The quality of frozen foods is influenced by the freezing rate, thawing method and temperature fluctuations that occur during storage (Zhang et al. 2022a). The application of high freezing rates promotes rapid freezing, which evenly distributes small ice crystals throughout the food matrix; in contrast, slow freezing forms large ice crystals that cause tissue damage, generating sensory and nutritional losses of the product (Li and Sun 2002; James et al. 2015). In addition, temperature fluctuation during the storage of frozen foods favors ice recrystallization, a phenomenon in which larger ice crystals are formed to the detriment of smaller crystals (Zhu et al. 2019).

Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) provide a source of energy, carbohydrates and dietary fiber and are composed of water and 20 % dry matter (Singh and Kaur 2016). This tuber is the fourth most important crop worldwide, and 30 % of potatoes are sold frozen. When the tissues of plants, such as potatoes, are frozen, irreversible changes are caused by chilling damage, solute concentration damage, dehydration damage and mechanical damage due to the formation of ice crystals (Reid 1993). To minimize the damage caused by freezing, a pretreatment process can be performed in which products are infused in cryoprotectants before freezing.

Sugars are traditional cryoprotectants that add sweetness to foods. Recently, alternative and innovative cryoprotectants have gained prominence, including the protein hydrolysates of gelatin and collagen and nanomaterials. These compounds work by inhibiting the growth of ice crystals, modifying the morphology of the crystals and delaying the recrystallization caused by temperature fluctuations (Davies 2014; Zhang et al. 2022b; Zhu et al. 2021). Reports have stated that nanometric materials act by protecting proteins and lipids from structural changes (Zhu et al. 2021), and these materials influence the formation of ice crystals due to their size. Protein hydrolysates contain hydrophilic amino acids (Glu and Asp) that act by inhibiting the formation of large ice crystals (Zhang et al. 2022b). In addition, ice crystal growth is efficiently inhibited by the presence of Gly-X-Y type tripeptides, which form an oxygen triad plane at the terminal and exhibit oxygen–oxygen distances similar to ice nuclei (Damodaran 2007; Zhu et al. 2021).

In some food systems, cellulose nanomaterials have shown significant beneficial effects on the growth and recrystallization of ice crystals, thus preserving their quality (Li et al. 2021; Li et al. 2019; Li et al. 2022; Nahr et al. 2015; Tan et al. 2022). Cellulose is a renewable,

biodegradable and nontoxic carbohydrate, and when isolated in the form of nanofibers, this material has the shape of fibrils with a diameter of 10 to 100 nm; in addition, cellulose can be obtained via mechanical homogenization of lignocellulosic biomass (Nechyporchuk et al. 2016). Its high surface area, water absorption capacity and rheological properties have favored its application in foods (Perumal et al. 2022), but its application as a cryopreservation material remains poorly investigated.

Separately, cellulose nanofibers and gelatin hydrolysate exhibit cryoprotective effects, but no study has explored the simultaneous application of these compounds in frozen potatoes. In addition to being widely marketed in frozen form, potato is a food that exhibits a uniform microstructure and consistent tissue, which facilitates the visualization of the effects in new freezing applications (Otero and Pozo 2022). And the mixing cryoprotectants is an interesting strategy because the blend can have a more effective cryoprotective action than the isolated compound (Sultanbawa and Li-Chan 1998), as observed by Nian et al. (2019) and Cai et al. (2019) in frozen red sea bream meat and Santarelli et al. (2021) in frozen carrots.

In this context, the present study aimed evaluated the combined effect of gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF) vacuum-impregnated on potatoes. The influence of these compounds on freezing, thawing, microstructure, staining, fluid cellular loss and texture loss of this food matrix when stored frozen with and without temperature fluctuation was examined.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Material

Fish skin gelatin was purchased from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich Brazil Ltda, São Paulo, Brazil), and papain (EC 3.4.22.2) and the amino acid *L*-cysteine were purchased from Dinâmica (São Paulo, Brazil). Papain used has an enzymatic activity of  $0.0042 \pm 0.001$  UA/mg (Melo et al. 2023). The commercial bleached kraft pulp of *Pinus* sp. was provided by the forestry nanotechnology laboratory, located at the Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil, for the preparation of cellulose nanofibers. Freshly harvested potatoes (*Solanum tuberosum* L.) were purchased from local stores in Lavras, Minas Gerais, Brazil (geographical coordinates 21° 14' 45" south and 44° 59' 59" west). All chemical reagents used, including hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH) and other used products described throughout the methodology, were of analytical grade.

## 2.2 Gelatin hydrolysis

The fish skin gelatin hydrolysate was prepared by applying the conditions reported by Damodaran (2007). Briefly, a 20 % (w/w) fish skin gelatin solution was prepared in deionized water containing 10 mM cysteine, and the pH was adjusted to 7.0 with NaOH (2 mol L<sup>-1</sup>). Papain was added at an enzyme/substrate ratio of 1:100, and the solution was incubated in a water bath at 37 °C for 10 min. The hydrolysis was stopped by boiling the solution for 5 min. Then, the samples were cooled in running water, frozen at -75 °C in an Ultra Freezer (model CL 120-86 V, Coldlab, Brazil) for 24 h and lyophilized for 72 h in a freeze-dryer (model L4KR, Edwards, Brazil) at -20 °C with a vacuum pressure of 0.998 mbar.

## 2.3 Electrophoresis (SDS–PAGE)

The molecular weight of the peptides obtained by the hydrolysis of gelatin was determined by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) using a Mini-PROTEAN Tetra vertical electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, INC., USA). The acrylamide gel was prepared using a 12 % separating gel and a 5 % stacking gel. The hydrolysate sample (20 % w/w) was then diluted in denaturing buffer (containing sodium dodecyl sulfate, bromophenol blue, glycerol and β-mercaptoethanol) at a proportion of 200 μL of sample: 200 μL of denaturing buffer and heated to 90 °C for 10 min. Subsequently, 15 μL aliquots of denatured sample were injected into the gel. SigmaMaker™ (200 kDa to 6.5 kDa; Sigma–Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brazil) was used as a molecular weight marker. The electrophoretic run was performed for 2 h at 100 V and 30 mA.

## 2.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The freeze-dried GH was subjected to FTIR by the attenuated total reflectance (ATR) technique in a Bruker FTIR spectrophotometer (Vertex 70, USA). The infrared region analyzed ranged from 4000 cm<sup>-1</sup> to 500 cm<sup>-1</sup> with 64 scans and a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>.

## 2.5 Synthesis of CNF

Cellulosic suspensions of *Pinus* sp. with a concentration of 2 % w/w were mechanically fibrillated in a microfibrillator mill, Super Masscolloider (Masuko®, Sangyo – Model MKCA6-2, Japan). Five passes were performed in the mill with a rotation of 1,500 rpm. The distance

between the discs of stones was 10  $\mu\text{m}$ , and the adjustment was performed gradually by observing the increase in suspension viscosity (Setter et al. 2023). The solids content of the CNF paste obtained was  $1.23 \pm 0.15\%$ .

## 2.6 Microstructure and size distribution of CNF

The morphology of the CNF was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). A small drop of cellulose nanofiber solution (0.001 % w/w) was fixed on supports (*stub*), coated with gold and examined using an ultrahigh resolution scanning electron microscope (Tescan-Clara, Czech Republic) with an accelerating voltage of 15 kV. The diameter of the cellulose nanofibers was determined by performing fifty measurements with ImageJ software.

## 2.7 Experimental design

GH and CNF were combined in a central composite rotational design (CCRD), and the actual and coded levels are presented in Table 1. The values used were determined from previous reports (Li et al. 2019; Limpisophon et al. 2015; Lin et al. 2019; Nahr et al. 2015; Tan et al. 2022; Zhang et al. 2020). Twelve treatments were performed, four factorial points, four axial points and four replicates at the central point. The solutions were prepared by dissolving the components in water at the respective concentrations and stirring the mixture on a vortex mixer for 3 min at 3,800 rpm. Subsequently, the solutions were placed in an ultrasonic bath (Model USC-1600 A, Unique, Brazil) for 1 h and stored under refrigeration for subsequent applications.

**Table 1** Central Compound Rotational Design (CCRD) variables

Variables (% w/w)	-1.41	-1	0	+1	+1.41
Gelatin hydrolysate concentration (GH)	0.08	0.70	2.20	3.70	4.32
Cellulose nanofiber concentration (CNF)	0.08	0.70	2.20	3.70	4.32

## 2.8 Determination of the supercooling point and freezable water content of GH and CNF solutions

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to determine the supercooling point and the freezable water content of the solutions containing the GH and CNF combinations. Samples of approximately 10 mg of solution were placed in sealed aluminum pans and analyzed in a calorimeter (TA Instruments, mod. DSC Q200, USA). The samples were frozen to  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a constant cooling rate of  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to obtain the supercooling point. The samples were placed at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min and heated at a heating rate of  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  until  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  was reached and the ice crystals were completely melted. Then, the melting point was recorded. From the DSC curves, the freezable water content ( $F_W$ ) could be calculated by Eq. 1 (Tan et al. 2022). Thermograms were analyzed using TA Universal Analysis 2000 software.

$$F_W (\%) = \left( \frac{\Delta H_m}{\Delta H_w} \right) \times 100 \quad (1)$$

where  $\Delta H_m$  is the enthalpy of melting of the sample ( $\text{J g}^{-1}$ ) and  $\Delta H_w$  is the endothermic enthalpy of pure water at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $333.88\text{ J g}^{-1}$ ).

## 2.9 Application of the solution with GH and CNF in potato

Potatoes with similar firmness and maturation were selected, sanitized, dried, peeled and cut into toothpicks. Potato cuts measuring 3 cm high, 0.5 cm wide and 0.5 cm long were blanched at  $83\text{-}84\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 2 min (Ullah et al. 2014). Subsequently, the potatoes were vacuum impregnated with GH and CNF solutions at different concentrations (Table 1).

The vacuum impregnation procedure was performed in a Precision Scientific Vacuum Oven 19 vacuum oven (Thermo Fisher Scientific, USA) with a pressure of 15 in Hg (50.8 kPa) and a temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min. To increase the impregnation of the compounds, the vacuum was briefly interrupted every 10 min. Subsequently, the samples left for 10 min at atmospheric pressure, removed from the solutions, dried on absorbent paper, packed in polyethylene bags and frozen at  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a horizontal freezer. The sample volume:solution volume ratio was 1:10. The procedure was performed with twenty replicates, and samples without impregnation (only bleached) were used as controls.

The temperature profiles of the impregnated potatoes during the freezing and thawing processes were obtained by inserting T-type thermocouples (copper-constantan) of 1.5 mm in

diameter and 100 mm in length in the geometric center of the potatoes. The sensors were connected to a signal conditioning system (National Instruments - Model SCXI - Hungary), and temperature measurements were taken at 10-second intervals using LabVIEW 8.5 software.

### 2.9.1 Rheology of impregnating solutions

The rheological behaviors of the solutions before and after the potato impregnation process were analyzed in triplicate at 25 °C. The viscosities of the solutions were determined using a concentric tube rotational viscometer (Brookfield DVIII Ultra, Brookfield Engineering Laboratories, USA). The SC4-18 spindle was used in an increasing ramp with a deformation rate of 19.81 s<sup>-1</sup> to 217.81 s<sup>-1</sup>. The Newtonian model (Eq. 2) was fitted to the shear stress and strain rate data to determine the fluid flow profile (Steffe 1996).

$$\sigma = \mu\dot{\gamma} \quad (2)$$

where  $\sigma$  is the shear stress (Pa),  $\mu$  is the viscosity (mPa s) and  $\dot{\gamma}$  is the strain rate (s<sup>-1</sup>).

### 2.10 Temperature fluctuation procedure

After vacuum impregnation, the potato samples were packaged and frozen at -24 °C for 4 days. The samples were equally divided into two portions; one portion was stored at -24 °C, and the other was subjected to temperature fluctuation as described by Kumar et al. (2019) with modifications. The temperature fluctuation procedure was performed according to the following steps: potatoes stored at -24 °C were heated to -12 °C, cooled to -24 °C, heated to -6 °C, cooled to -24 °C, heated to 0 °C and cooled again to -24 °C. This cycle was performed 5 times, and the time necessary to reach the respective temperatures was determined by pretests. Subsequently, all samples subjected and not subjected to thermal cycling were thawed at 7 °C for 12 h and analyzed.

## 2.11 Quality analyses

### 2.11.1 Loss of cellular fluid

Cellular fluid losses were quantified by the variation in sample mass after the vacuum impregnation process and after thawing. After the vacuum impregnation process, the samples were drained with absorbent paper and weighed on an analytical balance (Shimadzu, ATX 224, Japan). Thawing was performed in a refrigerator at 7 °C for 12 h, the samples were drained again and weighed, and the cell fluid loss was calculated by Eq. 3.

$$m_p(\%) = \left| \frac{m_T - m_I}{m_I} \times 100 \right| \quad (3)$$

where  $m_p$  is the percentage of fluid lost during thawing,  $m_I$  is the initial mass of the impregnated potato cut or control and  $m_T$  is the mass of the potato cut after thawing.

### 2.11.2 Instrumental texture measurement

The mechanical properties of the vacuum-impregnated, frozen and thawed potatoes and the control potatoes with and without thermal cycling were assessed by texture profile analysis (TPA) using a texturometer (mod. TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, United Kingdom) (Kumar et al. 2019). The frozen potatoes were stored at 7 °C for 12 h. The equipment was calibrated with a 5 kg load cell, and the samples were subjected to a 50 % uniaxial compression test with a 75 mm diameter cylindrical probe at a compression speed of 1 mm s<sup>-1</sup>. For each treatment, the mechanical tests were performed with six replicates. The parallelepiped-shaped samples were deposited with the rectangular face supported in the analysis area. Data were collected using Texture Expert Exceed software (Stable Micro Systems, v. 2.64, Surrey, United Kingdom). The firmness of the samples was measured and expressed in newtons (N). The percentage by which the sample texture varied after thawing was calculated by inserting the mean firmness values into Eq. 4.

$$T(\%) = \left| \frac{Fm_T - Fm_C}{Fm_C} \times 100 \right| \quad (4)$$

where  $Fm_T$  is the maximum force exerted on the thawed sample (N),  $Fm_C$  is the maximum force exerted on the control sample and  $T$  is the percentage of texture lost after thawing.

### 2.11.3 Microstructural analysis of frozen potatoes by scanning electron microscopy (SEM)

After vacuum impregnation and freezing at  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the samples that were not subjected to thermal cycling were transferred to an Ultra Freezer (model CL 120-86 V, Coldlab, Brazil) at  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h and freeze-dried for 72 h in a freeze-dryer model L4KR (Edwards, Brazil) at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and with a vacuum pressure of 0.998 mbar. The same drying procedure was performed for the impregnated samples, which were frozen at  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  and subjected to thermal cycling. The dried samples were fixed on *stubs*, coated with gold and examined under a scanning electron microscope (Carl Zeiss LEO EVO 40 XVP, Oberkochen, Germany) with an accelerating voltage of 15 kV.

### 2.11.4 Staining

The colorimetric properties of control and vacuum-impregnated potatoes after thawing were examined using a Konica Minolta CM-5 colorimeter equipped with the CIELAB color system. The parameters  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h$  (Eq. 5) and  $C^*$  (Eq. 6) were measured.  $L^*$  indicates the brightness and ranges from 0 (black) to 100 (white),  $C^*$  (chroma) is the saturation index and indicates the intensity of the color, and  $h$  is the hue angle and indicates the observable color. This is because  $h$  is related to the parameters  $a^*$ , which vary from green to red ( $-a^*$ , green;  $+a^*$ , red) and  $b^*$ , which vary from blue to yellow ( $-b^*$ , blue;  $+b^*$ , yellow). The total color variation ( $\Delta E^*$ ) and the browning index ( $BI$ ) were calculated by Eqs. 7 and 8, respectively.

$$\text{Hue } (h) = [\tan^{-1}(b^*/a^*)] \quad (5)$$

$$\text{Chroma } (C^*) = [(a^{*2} + b^{*2})]^{1/2} \quad (6)$$

$$\Delta E^* = [(L^* - L_c^*)^2 + (a^* - a_c^*)^2 + (b^* - b_c^*)^2]^{1/2} \quad (7)$$

$$BI = \frac{100 \times (y - 0.31)}{0.172}, \quad y = \frac{a^* + (1.75 \times L^*)}{(5.645 \times L^*) + a^* - (3.012 \times b^*)} \quad (8)$$

where  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  are the colorimetric parameters of the frozen/thawed potato samples without temperature fluctuation, and  $L_c^*$ ,  $a_c^*$  and  $b_c^*$  are control samples without vacuum impregnation that were frozen/thawed without temperature fluctuation.

## 2.12 Statistical analyses

Chemoface software was used to design the experiment (CCRD) (Nunes et al. 2012). The concentration of GH and CNF was optimized by response surfaces methodology (RSM). The relationship between the variation of the response and the variation of factors was represented by a mathematical model using the Equation 9 (Rodrigues and Iemma 2014). The statistical package SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used.

$$y = \beta'_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 \quad (9)$$

where  $\beta'_0$  is the intercept term,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  are the linear coefficients;  $\beta_{12}$  is the interaction coefficient;  $\beta_{11}$  and  $\beta_{22}$  are the quadratic coefficients and  $x_1$  and  $x_2$  are the coded variables.

The rheological model was adjusted by the SAS University Edition statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), using three repetitions. Differences between mean values from treatments and control were analyzed by analysis of variance followed by Tukey's mean test ( $p < 0.05$ ). For this, the data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test ( $p < 0.01$ ) and the homogeneity of variance was analyzed using the Levene test ( $p < 0.01$ ), this check was performed using the Jamovi software (version 2.3.17). Graphs were constructed using SigmaPlot software, version 12 (Systat Software, Inc., San Jose, USA).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Characterization of GH and CNF

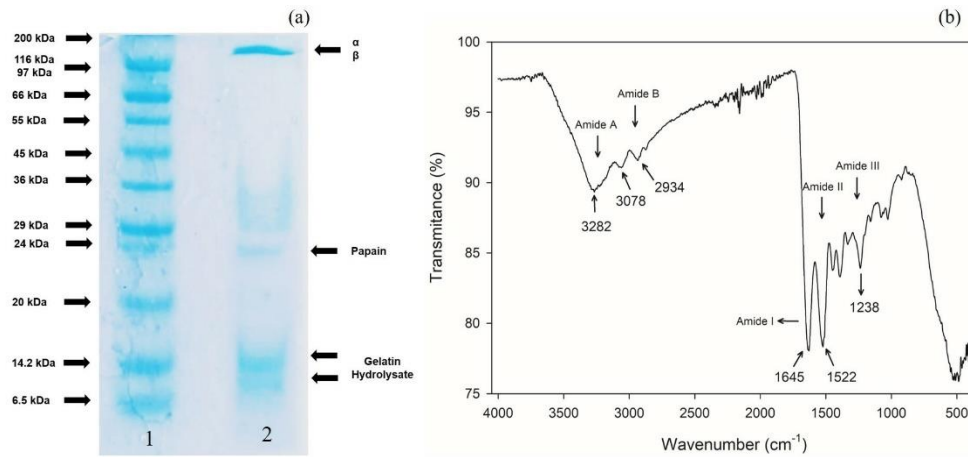
The hydrolysis of gelatin using papain protease generates peptides with a molecular weight range that can be analyzed by electrophoresis. The SDS–PAGE gel (Fig. 1a) shows a band located between 200 kDa and 116 kDa, which can be attributed to collagen fragments ( $\alpha$  and  $\beta$ ) that did not undergo intense enzymatic hydrolysis. Bands in this region can be attributed to different conformations of collagen proteins, since in the gelatin manufacturing process, collagen is fractionated into three fractions, and the  $\alpha$  and  $\beta$  chains are fractions with molecular weights between 80-125 kDa and 160-250 kDa, respectively (Lv et al. 2019).

When analyzing gelatines from the skin of gilt mullet (*L. aurata*), Bkhairia et al. (2016) observed a band at 175 kDa attributable to  $\beta$  chains. In addition, when performing electrophoresis of gelatin hydrolysate of tilapia scales, Cao et al. (2021) found a band at 150 kDa attributable to  $\alpha$  chains. The gelatin portion degraded by the enzyme is composed of peptide fractions with a molecular weight range that varies from 14.2 kDa to 6.5 kDa (Fig. 1a).

Polypeptides of this size exhibit inhibitory activity on ice crystal growth, as observed by Damodaran (2007), who used gelatin hydrolysate in ice cream subjected to thermal cycling. An electrophoretic band at approximately 24 kDa was also observed, which was attributed to papain remaining in the mixture.

The FTIR spectral profile (Fig. 1b) confirmed the presence of protein structures in the secondary conformation of  $\beta$ -sheets because the amide I bands ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) indicate this folding behavior (Yuan et al. 2018; Zhang et al. 2019). The presence of a  $\beta$ -sheet structure in the sample indicates that the native structure was disrupted during hydrolysis (Elavarasan et al. 2016). The production of gelatin hydrolysate generates cryoprotective peptides composed of an amino acid sequence that contains glycine (Gly-XY) (Damodaran 2007); however, in the FTIR spectrum, it is difficult to identify bands attributed to the structures of these peptides since the protein hydrolysate consists of a mixture of peptides (Elavarasan et al. 2016). Furthermore, in the amide I region ( $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ), there is a band at  $1645\text{ cm}^{-1}$  corresponding mainly to the C=O stretching vibration, which can be attributed to the carbonyl involved in the peptide bond of glycine with the preceding amino acid (Bryan et al. 2007; Ruiz-Rodriguez et al. 2021). The amide II band ( $1522\text{ cm}^{-1}$ ), located between  $1500$  and  $1580\text{ cm}^{-1}$ , corresponds to the bending (change in angle -  $\delta$ ) of the NH bond of glycine (Ruiz-Rodriguez et al. 2021). The amide III band at  $1238\text{ cm}^{-1}$  is related to the CN elongation of the amide bonds, the bending in the NH plane and the oscillating  $\text{CH}_2$  vibrations caused by the proline side chain (Elavarasan et al. 2016), which is an amino acid that may be positioned after glycine in cryoprotective peptides.

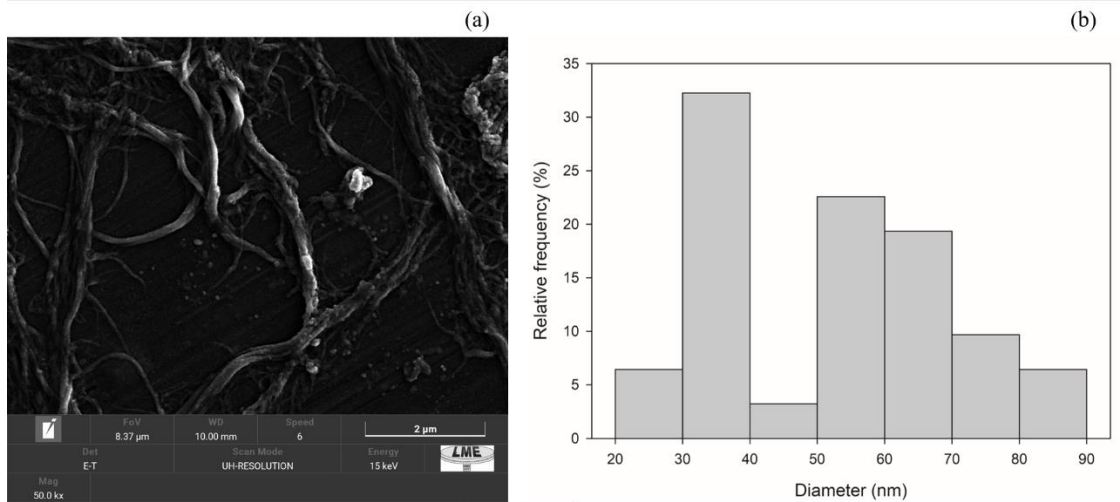
The spectrum (Fig 1b) also exhibited a broad peak at  $3282\text{ cm}^{-1}$ , attributed to the OH elongation of OH functional groups, which perform hydrogen bonds with other nearby functional groups and are not available for interactions (Elavarasan et al. 2016). Although evidence suggests that hydrogen bonds are present that stabilize the protein structure, the lower intensity of the amide III band ( $1238\text{ cm}^{-1}$ ) indicates chain disorder and loss of the triple helix state (Muyonga et al. 2004) due to the hydrolysis process. Two smaller peaks located at  $3078$  and  $2934\text{ cm}^{-1}$  were also observed, which are associated with the stretching vibrations NH and  $\text{CH}_2$  (Zhang et al. 2019).



**Fig. 1** (a) Sulphate-polyacrylamide electrophoresis gel (SDS-PAGE) analysis of fish skin gelatin hydrolysate. (1) Molecular marker and (2) Gelatin hydrolysate (GH); (b) Infrared absorption spectra of fish skin gelatin hydrolysate

### 3.2 Microstructure and size distribution of the CNF

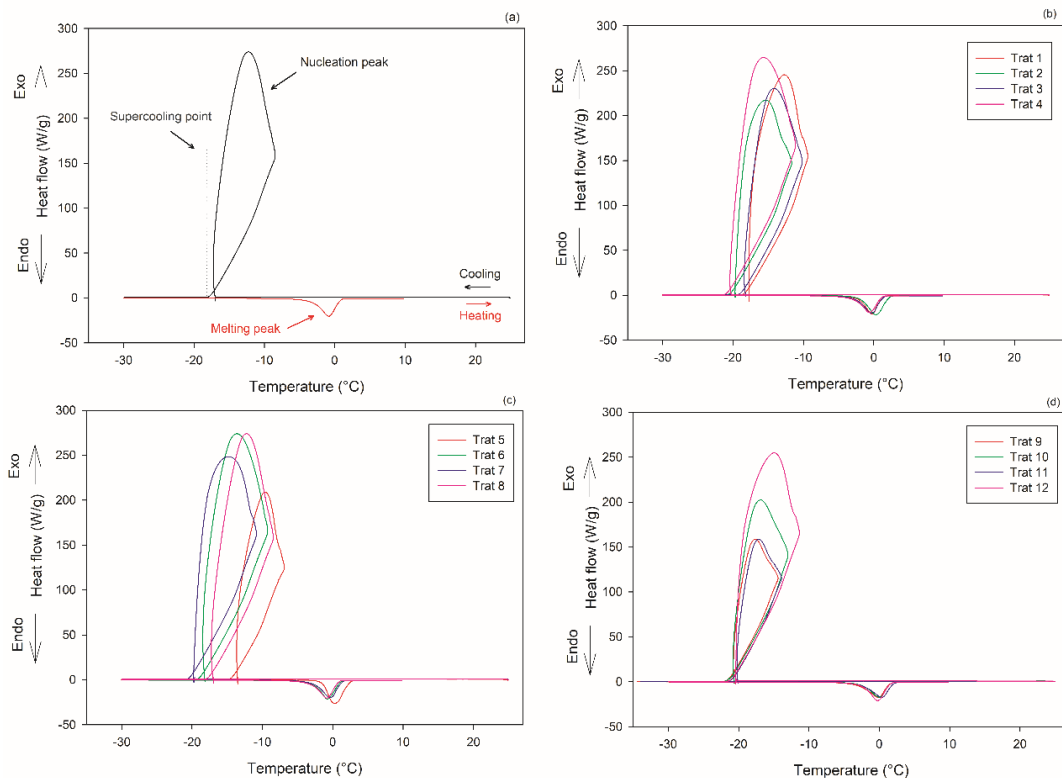
The morphology of the CNF obtained after the mechanical fibrillation process is shown in the electron micrograph of Fig. 2a. The CNF are shaped by long fibrils that are arranged individually and in bundles, and the fibril diameter distribution range is between 20 and 90 nm, with a higher relative frequency of diameters between 30 and 40 nm (Fig. 2b). Investigations by Welti, Stetzer & Lohmann (2009) indicated that particles with a size of 1 to 100 nm can induce ice nucleation; thus, in food applications, this nanometric material may function by inducing the formation of ice crystals uniformly distributed throughout the food matrix. In addition, studies have shown that nanocellulose has an amphipathic structure that exhibits high performance in inhibiting ice recrystallization (Li et al. 2021; Li et al. 2019, 2020; Tan et al. 2022).



**Fig. 2** (a) Scanning electron micrograph at 50,000x magnification of the cellulose nanofibers (CNF); (b) Size distribution of CNF diameters

### 3.3 Differential scanning calorimetry of GH and CNF solutions

Fig. 3 shows the DSC curves obtained for the freezing and melting processes of aqueous solutions containing GH and CNF at different concentrations. The thermograms show a peak that indicates the nucleation of the solutions during the cooling process and a peak in the melting temperature during the heating process. The freezing process is performed by cooling the product below the starting point of freezing. Then, the latent heat of crystallization is removed, and finally, the product is cooled to the final temperature needed. During crystallization, nucleation and subsequent growth of ice crystals occur. In these processes, the supercooling of the solution acts as a driving force that promotes the phase change (Kiani and Sun 2011).



**Fig. 3** Differential scanning calorimetry curves of freezing ( $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) and melting ( $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) of impregnating solutions containing gelatin hydrolysate (GH) and CNF

The supercooling temperature is the lowest temperature that the supercooled solution can reach with the release of latent heat before the water-ice phase transition (Zhao et al. 2022). The impregnating solutions containing 2.20 % GH and 2.20 % CNF showed the lowest supercooling temperatures (Table 2), and according to Zhao et al. (2022) (Zhao et al. 2022), low values of this temperature indicate a greater restriction effect on the growth of ice crystals. Based on this effect, incorporating these compounds into foods reduces the formation of large ice crystals that can irreversibly rupture food tissue; therefore, the effect is advantageous.

Table 2 shows that the solutions presented a percentage of freezable water ranging from 89.31 to 99.62%. Considering pure water (melting point  $0.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\Delta H_w = 333.88\text{ J g}^{-1}$ ), the results show that GH and CNF decreased the freezable water content of the aqueous solutions. When the two compounds were used together at concentrations of 2.20 % each, a lower content of freezing water was observed (Table 2). The influence of these compounds on ice crystallization can be attributed to the interactions between the hydrophilic regions of the CNF and the water molecules by hydrogen bonds (Tan et al. 2022). This same mechanism may occur between GH and the surrounding water molecules due to the hydrophilic regions of the peptides. The

presence of the amino acids glutamic acid, aspartic acid and lysine in the hydrolysate may also interact with water molecules by noncovalent bonding (Chen et al. 2022).

**Table 2** Thermal parameters of impregnating solutions containing different concentrations of gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF)

Treatments	Gelatin hydrolysate (% w/w)	Cellulose nanofibers (% w/w)	Supercooling temperature (°C)	Freezable water content (%)
1	-1 (0.70)	-1 (0.70)	-18.49	97.52
2	-1 (0.70)	1 (3.70)	-20.45	95.57
3	1 (3.70)	-1 (0.70)	-18.98	92.64
4	1 (3.70)	1 (3.70)	-20.82	93.18
5	-1.41 (0.08)	0 (2.20)	-14.53	99.62
6	1.41 (4.32)	0 (2.20)	-19.10	89.31
7	0 (2.20)	-1.41 (0.08)	-20.49	93.96
8	0 (2.20)	1.41 (4.32)	-17.82	97.40
9	0 (2.20)	0 (2.20)	-21.79	92.70
10	0 (2.20)	0 (2.20)	-21.26	92.53
11	0 (2.20)	0 (2.20)	-21.17	92.85
12	0 (2.20)	0 (2.20)	-21.41	91.89

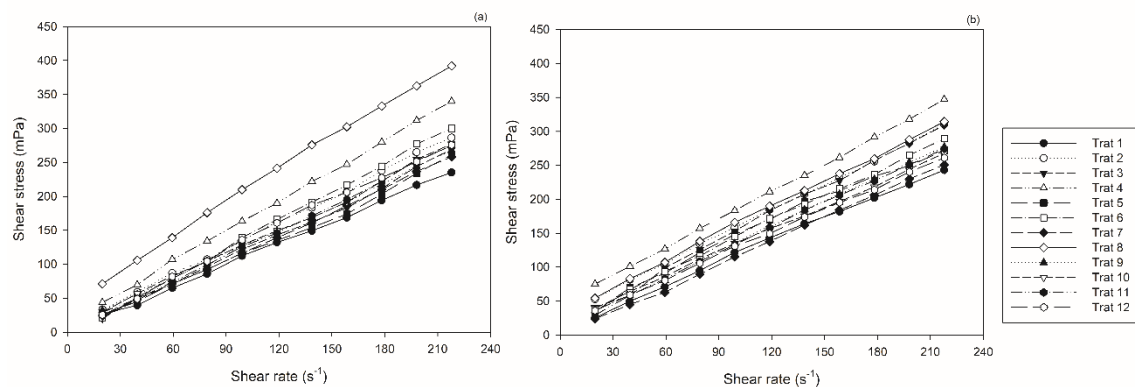
### 3.4 Rheological behavior of cryoprotectant solutions

The process of impregnating food through a vacuum involves incorporating the impregnating solution inside the tissues; therefore, knowing the rheological profile of these solutions is an important factor. Fig. 4a and b shows the variations in shear stress as a function of the solution strain rate before and after the potatoes underwent vacuum impregnation. The graphs in Fig. 4 show that flow profile exhibits characteristics of a Newtonian fluid because there is a linear relationship between shear stress and strain rate. In addition, the Newtonian model showed a good fit to the experimental data with high values for the coefficient of determination  $R^2 \geq 0.974$  and low values for the root mean square error ( $RMSE \leq 0.025$ ) (Table 3).

Before the impregnation process, the solutions presented viscosities ranging from  $1.087 \pm 0.079$  mPa s to  $1.920 \pm 0.099$  mPa s, and these values were generated because the solutions

contained lower solids content (0.70 % m/m GH and 0.70 % m/m CNF, Trat 1) and higher content of cellulose nanofibers (0.08 % m/w GH and 4.32 % w/w CNF, Trat 8), respectively. The Newtonian behavior suggests that the viscosity remains constant for a given temperature, regardless of the time and strain rate applied to the fluid. The low viscosities of the impregnating solutions observed in this study favored vacuum impregnation because the solutions increased the diffusivity of the compounds during mass transfer between the solution and porous solid matrix of the food, which was intensified when a pressure gradient was applied (Betoret et al. 2015).

The solutions corresponding to treatments 4 and 6 to 12 showed a reduction in viscosity (Table 3). These results indicate that the solution components were effectively incorporated into the potato cuts because the decrease in total solids content reduces the solution viscosity (Steffe 1996). The viscosities of the solutions corresponding to the other treatments exhibited a slight increase, which can be attributed to the transfer of soluble compounds, such as starch, from the potato to the impregnant liquid.



**Fig. 4** Flow curves of cryoprotectant solutions: (a) before the impregnation process; (b) after the impregnation process

**Table 3** Rheological parameters of impregnating solutions

Treatments	Before impregnation			After impregnation			$\Delta\mu$
	$\mu$ (mPa s)	R <sup>2</sup>	RMSE	$\mu$ (mPa s)	R <sup>2</sup>	RMSE	
1	1.087 ± 0.079	0.991	0.006	1.115 ± 0.003	0.992	0.006	0.028
2	1.338 ± 0.079	0.99	0.008	1.479 ± 0.063	0.985	0.015	0.141
3	1.211 ± 0.011	0.994	0.006	1.460 ± 0.105	0.981	0.011	0.249
4	1.577 ± 0.114	0.979	0.013	1.574 ± 0.044	0.985	0.023	-0.004
5	1.144 ± 0.051	0.988	0.008	1.248 ± 0.082	0.992	0.007	0.104
6	1.374 ± 0.032	0.993	0.007	1.308 ± 0.023	0.976	0.01	-0.067
7	1.170 ± 0.062	0.989	0.008	1.153 ± 0.045	0.995	0.005	-0.017
8	1.920 ± 0.099	0.974	0.025	1.512 ± 0.117	0.984	0.011	-0.408
9	1.297 ± 0.071	0.985	0.009	1.240 ± 0.051	0.986	0.009	-0.057
10	1.294 ± 0.086	0.988	0.009	1.241 ± 0.005	0.982	0.01	-0.054
11	1.307 ± 0.107	0.992	0.007	1.245 ± 0.039	0.981	0.01	-0.061
12	1.287 ± 0.064	0.987	0.008	1.233 ± 0.059	0.985	0.009	-0.054

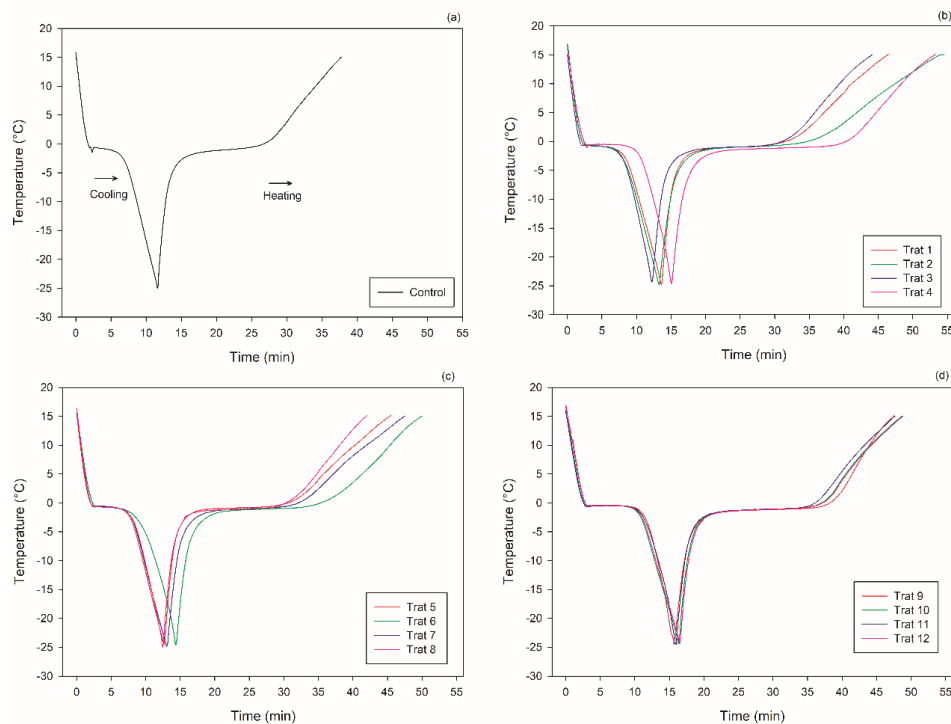
R<sup>2</sup>: coefficient of determination, RMSE: root mean square error,  $\mu$  viscosity (mPa.s).

### 3.5 Effect of cryoprotectants on the freezing and thawing processes in potatoes

Fig. 5 presents a history of the freezing and thawing temperatures for pretreated potatoes obtained by monitoring the temperature at the geometric center of the samples over time. The precooling, phase transition and final cooling stages during freezing and the preliminary heating, melting and final heating stages during thawing are shown in the same curve (Liu et al. 2021). The supercooling points could not be identified in some curves, while in others, this point was observed in a subtle manner. The freezing points of potatoes impregnated with GH and CNF were within -0.631 °C to -0.780 °C (Table 4), and a reduction in the freezing points was observed for potatoes impregnated with cryoprotectants in the tissues compared to the control potato (-0.615 °C). The total freezing time until the temperature at the geometric center

reached  $-24.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ranged from 12.17 to 16.50 min. The longest processing time was observed with the application of 2.20 % w/w GH and 2.20 % w/w CNF (16.50 min) compared to the control sample (11.50 min) (Table 4). This behavior results from the interaction between the impregnated compounds and the water molecules present in the potato tissue.

The freezing temperatures observed for the control sample (sample only blanched) and for the samples blanched and pretreated by vacuum impregnation were lower than the freezing temperature of natural potatoes ( $-1.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); this difference is attributed to the loss of solutes during bleaching and impregnation and higher water content in the samples (Kumar et al. 2018). In addition, importantly, during the blanching process, part of the starch present in the potato can gelatinize and firmly absorb a large amount of water (Donmez et al. 2021). Consequently, the thermal properties of the potato will significantly change (Kumar et al. 2018). As shown in Fig. 5, cryoprotectants slightly delayed the thawing of potatoes; in this condition, the water can slowly return to its original location in the tissues through the process of diffusion (Colla and Prentice-Hernández 2003).



**Fig. 5** Freezing/thawing curves of potatoes impregnated with a solution with different concentrations of gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF)

**Table 4** Effects of GH and CNF impregnation on fluid loss and texture of thawed potato after freezing with and without temperature fluctuation

Treatments	Gelatin hydrolysate (% w/w)	Cellulose nanofibers (% w/w)	Without temperature fluctuation		With temperature fluctuation		Freezing point (°C)	Freezing time (min)
			(%) Loss of cellular fluid	(%) Loss of texture	(%) Loss of cellular fluid	(%) Loss of texture		
1	-1 (0.70)	-1 (0.70)	23.47 ± 2.38 <sup>abc</sup>	39.76 ± 2.71 <sup>ab</sup>	43.02 ± 2.47 <sup>a</sup>	76.29 ± 6.37 <sup>ab</sup>	-0.697	13.50
2	-1 (0.70)	1 (3.70)	25.94 ± 0.77 <sup>a</sup>	35.34 ± 0.64 <sup>bc</sup>	33.40 ± 4.58 <sup>bcd</sup>	59.51 ± 1.66 <sup>c</sup>	-0.698	13.17
3	1 (3.70)	-1 (0.70)	24.69 ± 2.47 <sup>ab</sup>	34.60 ± 2.45 <sup>bc</sup>	36.36 ± 2.47 <sup>abc</sup>	76.23 ± 4.06 <sup>ab</sup>	-0.780	12.17
4	1 (3.70)	1 (3.70)	21.60 ± 0.24 <sup>bcd</sup>	28.76 ± 1.28 <sup>cde</sup>	38.50 ± 4.63 <sup>ab</sup>	55.66 ± 0.84 <sup>c</sup>	-0.647	15.00
5	-1.41 (0.08)	0 (2.20)	21.76 ± 0.67 <sup>bcd</sup>	34.27 ± 3.18 <sup>bc</sup>	35.36 ± 1.42 <sup>abcd</sup>	65.92 ± 2.98 <sup>bc</sup>	-0.689	12.67
6	1.41 (4.32)	0 (2.20)	20.33 ± 1.37 <sup>cde</sup>	25.35 ± 1.63 <sup>de</sup>	28.54 ± 2.30 <sup>cd</sup>	59.93 ± 6.72 <sup>c</sup>	-0.688	14.33
7	0 (2.20)	-1.41 (0.08)	23.39 ± 2.40 <sup>abc</sup>	39.84 ± 4.93 <sup>ab</sup>	32.16 ± 0.68 <sup>bcd</sup>	81.29 ± 2.75 <sup>a</sup>	-0.631	13.00
8	0 (2.20)	1.41 (4.32)	19.93 ± 1.73 <sup>cde</sup>	30.50 ± 2.52 <sup>cd</sup>	32.17 ± 4.75 <sup>bcd</sup>	56.68 ± 3.00 <sup>c</sup>	-0.734	12.50
9	0 (2.20)	0 (2.20)	19.72 ± 0.54 <sup>cde</sup>	22.57 ± 1.54 <sup>e</sup>	28.40 ± 2.46 <sup>d</sup>	42.67 ± 3.27 <sup>d</sup>	-0.657	16.00
10	0 (2.20)	0 (2.20)	18.68 ± 1.37 <sup>e</sup>	23.88 ± 1.59 <sup>de</sup>	28.80 ± 2.23 <sup>cd</sup>	41.70 ± 1.97 <sup>d</sup>	-0.658	16.33
11	0 (2.20)	0 (2.20)	18.63 ± 2.41 <sup>e</sup>	23.35 ± 1.69 <sup>e</sup>	28.81 ± 3.92 <sup>cd</sup>	41.40 ± 2.41 <sup>d</sup>	-0.650	16.16
12	0 (2.20)	0 (2.20)	19.22 ± 0.70 <sup>de</sup>	23.41 ± 0.32 <sup>e</sup>	28.82 ± 4.17 <sup>cd</sup>	42.04 ± 4.71 <sup>d</sup>	-0.655	16.50
Control	-	-	23.16 ± 1.65 <sup>abcd</sup>	46.03 ± 2.52 <sup>a</sup>	32.12 ± 0.12 <sup>bcd</sup>	72.22 ± 4.14 <sup>ab</sup>	-0.615	11.50

\*Means ± standard deviation followed by the same letter within a column are not significantly different according to Tukey's test (p<0.05).

### **3.6 Characterization of potatoes impregnated with cryoprotectants and subjected to temperature fluctuation**

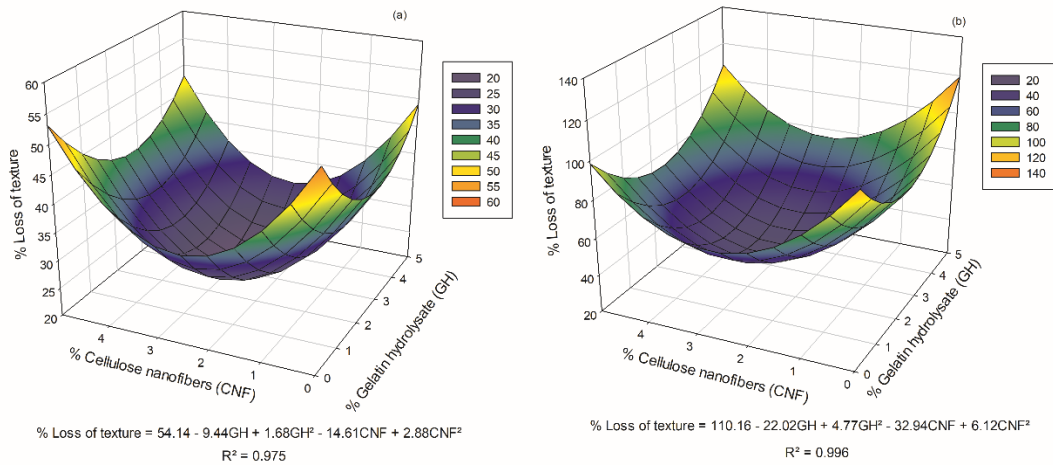
#### **3.6.1 Loss of cellular fluids and texture**

Potato is a tuber with a high water content ( $87.12 \pm 0.09$  % in this study). During the freezing process, part of the water becomes ice crystals, which exhibit a greater volume than that of liquid water. With growth, the ice crystals cause mechanical damage to the potato microstructure, which leads to loss of cellular fluids and texture after thawing. Table 4 shows the values obtained for these losses in pretreated and control potatoes after they were subjected to frozen storage with and without temperature fluctuation. The losses of cell fluids and texture were minimized when the potato was impregnated with 2.20 % w/w CNF and 2.20 % w/w GH. When these concentrations of cryoprotectants were applied, the percentage of drip loss in samples stored without temperature fluctuations was approximately 19 %, and this value was similar to that found by Bilbao-Sainz et al. (2020) and Otero and Pozo (2022) when minimally processed potatoes were frozen.

The loss of cellular fluids is attributed to the growth of ice crystals in the extracellular region, which cause the middle lamella that unites adjacent cells to rupture, leading to irreversible damage (Bilbao-Sainz et al. 2020). Water may also be osmotically transferred from the intracellular environment to the extracellular region, increasing the size of ice crystals and accentuating the structural tissue damage. Cold can also cause conformational changes in the lipid phase and in the proteins of the cell membrane, generating tissue changes (Reid 1993). The samples subjected to temperature fluctuation showed higher drip losses due to ice recrystallization. However, vacuum impregnation with 2.20 % w/w CNF and 2.20 % w/w GH also protected the food matrix against this phenomenon.

The rupture of cell walls and membranes in potatoes also causes a reduction in the turgidity pressure and stiffness of the tissues, softening the vegetable (Otero and Pozo 2022). For both storage methods, vacuum impregnation with an impregnating medium composed of 2.20 % w/w CNF and 2.20 % w/w GH could minimize the loss of potato texture, as illustrated in the graphs for the response surface their respective regressions (Fig. 6a and b). In both storage the linear and quadratic concentrations of CNF and GH were significant ( $p < 0.05$ ) in the texture loss values. The mathematical models presented a high coefficient of determination and the lack of fit was not significant ( $p > 0.05$ ). The reduction in texture loss due to the incorporated

compounds (2.20 % w/w CNF and 2.20 % w/w GH) is a satisfactory result, since texture is among the sensory aspects that greatly promotes the acceptance of potatoes by consumers (Sharma et al. 2020).



**Fig. 6** Response surface for potato texture loss: (a) Storage without temperature fluctuation, (b) Storage with temperature fluctuation

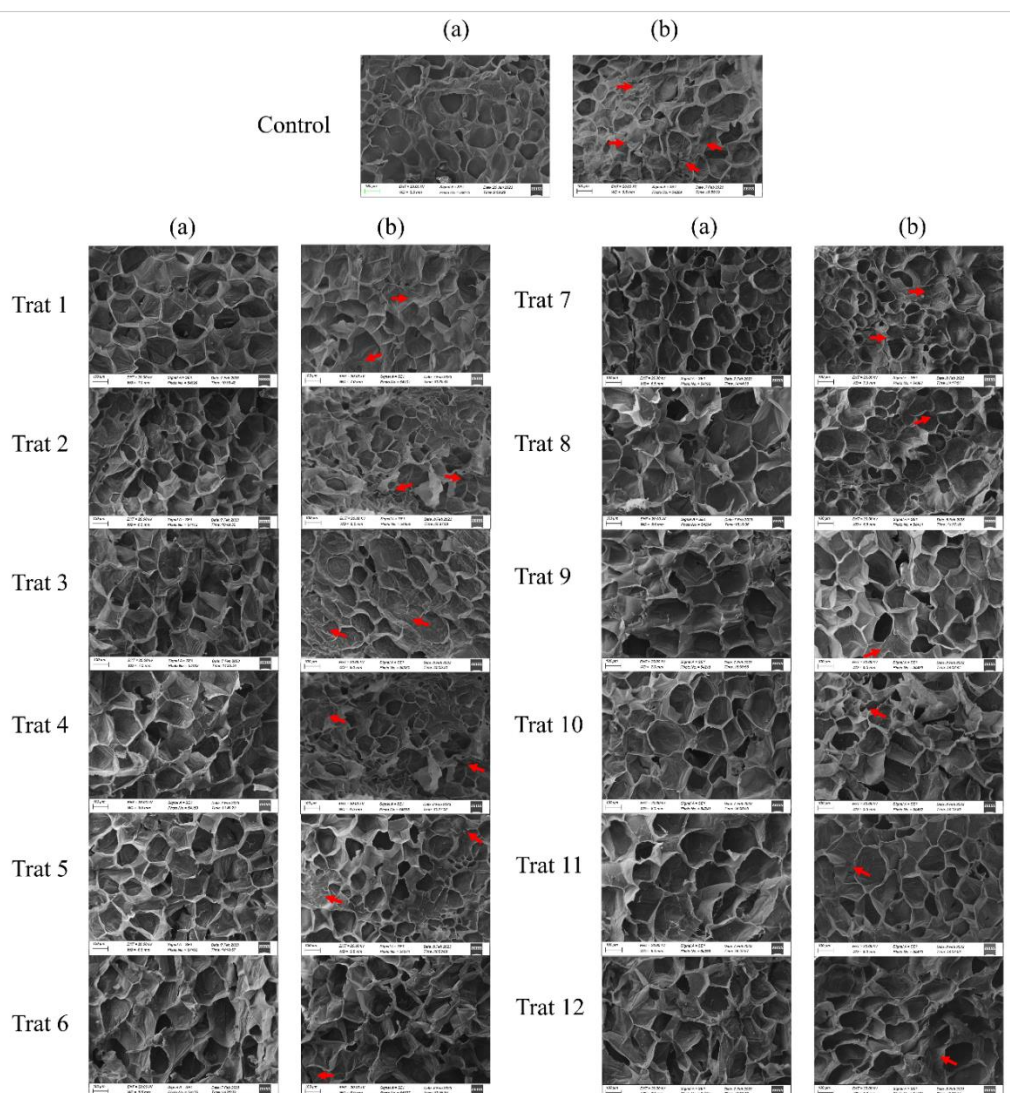
### 3.6.2 Microstructure of impregnated potatoes with and without temperature fluctuations

Fig. 7 contains electron micrographs of potatoes, which shows polyhedral shaped cells that contain few granules of incorporated starch due to blanching and impregnation, as part of the granules were leached. By comparing Figs. 7a and 7b, it was observed that the structural damage (ruptures indicated by red arrows) in the samples subjected to temperature fluctuation is higher than that in the samples stored without temperature fluctuation. In addition, pores could be observed in the samples, which were left by the ice crystals after the samples were sublimated in the freeze-drying process.

The micrographs of Fig. 7 corroborate the values of cell fluid and texture losses presented in Table 4. For all treatments, the average diameters of the potato cells were quantified and are shown in Table 5. The potato samples previously impregnated with 2.20 % w/w GH and 2.20 % w/w CNF showed larger cell diameters after frozen storage with and without temperature fluctuation compared to the control samples. This result indicates that less mechanical damage occurred and the loss of texture and intracellular fluid in these samples was

reduced. In addition, ice recrystallization was suppressed with these concentrations of cryoprotectants.

The delay in recrystallization from ice occurred because GH contains Gly-XY peptides that form an oxygen triad plane; this plane can form hydrogen bonds with the face of the ice crystal prism, thus slowing the growth of ice crystals during the recrystallization process (Damodaran 2007). Notably, the amino acids glycine and lysine can interact with ice crystals by hydrogen bonding to inhibit ice crystal growth (Chen et al. 2022). On the other hand, CNF inhibit recrystallization under conditions of low ionic strength (Li et al. 2019), as they delay the conversion of liquid water into freezable water during storage with temperature fluctuations and limit the mobility of water (Tan et al. 2022).



**Fig. 7** Micrographs of potatoes vacuum-impregnated with cellulose nanofibers and gelatin hydrolysate and free from pre-treatment stored under freezing: (a) without temperature fluctuation; (b) with temperature fluctuation. 200x magnification

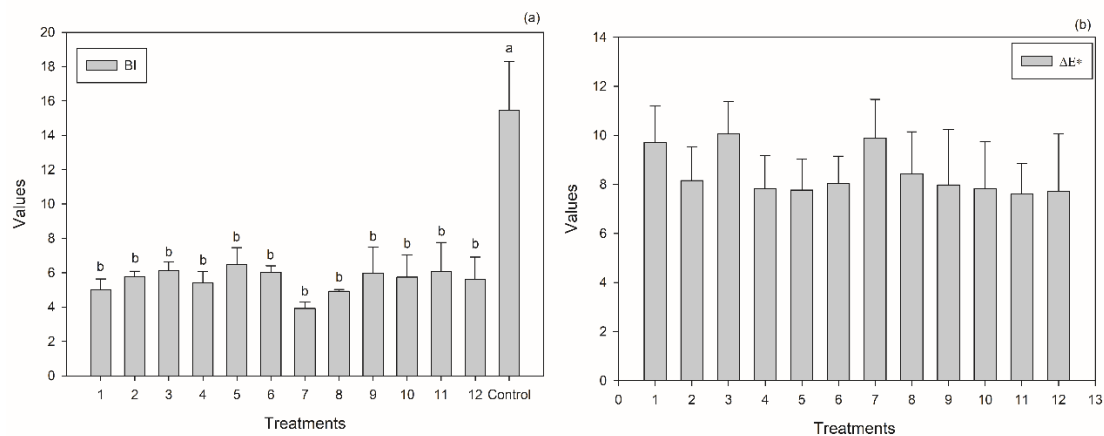
**Table 5** Effects of GH e CNF impregnation on the color and morphology of thawed potatoes after freezing

Treatments	Colorimetric parameters after freezing without temperature fluctuation			Average diameter of potato cells ( $\mu\text{m}$ )	
	Hue angle ( $h$ )	Chroma ( $C^*$ )	Lightness ( $L^*$ )	Without temperature fluctuation	With temperature fluctuation
1	98.97 $\pm$	4.30 $\pm$	74.46 $\pm$	59.12 $\pm$	50.65 $\pm$
	1.00 <sup>f</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.15 <sup>ab</sup>	10.86 <sup>b</sup>	6.30 <sup>b</sup>
2	106.37 $\pm$	5.62 $\pm$	73.43 $\pm$	56.83 $\pm$ 7.60 <sup>b</sup>	53.04 $\pm$ 8.31 <sup>b</sup>
	0.28 <sup>cde</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.20 <sup>bc</sup>		
3	102.35 $\pm$	5.70 $\pm$	76.67 $\pm$	56.74 $\pm$	50.61 $\pm$ 8.30 <sup>b</sup>
	0.72 <sup>ef</sup>	0.57 <sup>b</sup>	1.28 <sup>a</sup>	10.06 <sup>b</sup>	
4	105.70 $\pm$	5.02 $\pm$	70.92 $\pm$	57.59 $\pm$	51.38 $\pm$
	1.12 <sup>de</sup>	0.66 <sup>b</sup>	0.87 <sup>cd</sup>	12.19 <sup>b</sup>	10.62 <sup>b</sup>
5	107.75 $\pm$	6.45 $\pm$	73.40 $\pm$	57.47 $\pm$ 9.19 <sup>b</sup>	52.61 $\pm$
	2.03 <sup>bcde</sup>	0.77 <sup>b</sup>	1.20 <sup>bc</sup>		10.63 <sup>b</sup>
6	107.78 $\pm$	6.07 $\pm$	73.73 $\pm$	59.39 $\pm$	50.44 $\pm$ 7.40 <sup>b</sup>
	0.60 <sup>bcde</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.37 <sup>abc</sup>	10.14 <sup>b</sup>	
7	114.55 $\pm$	4.89 $\pm$	75.24 $\pm$	58.83 $\pm$ 7.72 <sup>b</sup>	50.16 $\pm$ 9.85 <sup>b</sup>
	1.02 <sup>a</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.54 <sup>ab</sup>		
8	107.10 $\pm$	4.83 $\pm$	72.46 $\pm$	79.02 $\pm$	52.69 $\pm$
	1.03 <sup>bcde</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.95 <sup>bcd</sup>	17.08 <sup>a</sup>	10.50 <sup>b</sup>
9	111.09 $\pm$	6.46 $\pm$	73.74 $\pm$	78.46 $\pm$	71.08 $\pm$ 9.49 <sup>a</sup>
	3.24 <sup>abcd</sup>	1.28 <sup>b</sup>	0.13 <sup>abc</sup>	15.06 <sup>a</sup>	
10	111.62 $\pm$	6.36 $\pm$	73.80 $\pm$	78.76 $\pm$	71.47 $\pm$
	3.88 <sup>abc</sup>	2.00 <sup>b</sup>	1.54 <sup>abc</sup>	14.86 <sup>a</sup>	11.08 <sup>a</sup>
11	111.37 $\pm$	6.62 $\pm$	73.48 $\pm$	78.23 $\pm$	71.01 $\pm$ 8.98 <sup>a</sup>
	3.23 <sup>abcd</sup>	1.46 <sup>b</sup>	1.47 <sup>bc</sup>	16.47 <sup>a</sup>	
12	112.59 $\pm$	6.37 $\pm$	73.27 $\pm$	78.81 $\pm$	71.31 $\pm$
	1.59 <sup>ab</sup>	1.39 <sup>b</sup>	2.15 <sup>bc</sup>	15.45 <sup>a</sup>	13.32 <sup>a</sup>
Control	92.69 $\pm$	25.50 $\pm$	69.46 $\pm$	58.59 $\pm$ 9.71 <sup>b</sup>	50.99 $\pm$ 9.51 <sup>b</sup>
	1.00 <sup>g</sup>	1.19 <sup>a</sup>	0.49 <sup>d</sup>		

\*Means  $\pm$  standard deviation followed by the same letter within a column are not significantly different according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### 3.6.3 Staining

The color attributes of the thawed potatoes after blanching, impregnation, freezing without temperature fluctuation and of the control sample are presented in Table 5. Vacuum impregnation of GH and CNF in potatoes promoted a reduction in chroma values ( $\leq 25.50 \pm 1.19$ ) and increased hue angle values ( $\geq 92.69 \pm 1.00$ ), indicating that the color intensity of the samples was decreased due to a possible loss in carotenoids on the potato surfaces (Gallego-Castillo and Ayala-Aponte 2018). The control sample presented the lowest value of  $L^*$  ( $69.46 \pm 0.49$ ), indicating that this sample contains slightly darker stains than the pretreated samples. The browning index ( $BI$ ) corroborates this information, as a more pronounced darkening could be observed on the surface of the potato control cuts after thawing (Fig. 8a). This result may be related to the mechanical damage caused by the freezing/thawing process since the ice crystals degrade the cell membranes, causing the leakage of pigments that are easily degraded by oxidation or enzymatic action (Gallego-Castillo and Ayala-Aponte 2018). In addition, the growth of ice crystals promotes the rupture of cellular organelles and the direct contact between enzymes and substrates, which favors browning reactions in potatoes (Otero and Pozo 2022). Regarding the total color variation ( $\Delta E^*$ ), the results were similar for all pretreated samples (Fig. 8b).



**Fig. 8** Color analysis of potatoes impregnated with different concentrations of frozen and thawed gelatin hydrolysate (GH) and cellulose nanofibers (CNF): (a) browning index ( $BI$ ); (b) total color variation ( $\Delta E^*$ ). The bars represent mean values and the error bar corresponds to the standard deviation. Bars with the same letter for the same color parameters are not significantly different according to ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

#### 4. CONCLUSIONS

The application of pretreatments involving vacuum impregnation of GH and CNF in potato cuts is a viable alternative to attenuate physicochemical and microstructural changes caused by the formation of ice crystals. Regression analysis was applied to obtain response surface methodology models that describe the response variables (texture loss, cell fluid loss, freezing point, freezing time, browning index and average potato cell diameter) in function of the variables noted in the CCRD (GH and CNF concentrations). The results of the analysis of variance (data not shown) indicated that the quadratic model was significant ( $p < 0.05$ ) and the lack of fit was not significant ( $p > 0.05$ ) only for texture loss. Considering that potato cut samples that underwent vacuum impregnation with solutions containing 2.20% w/w GH and 2.20% w/w CNF obtained lower loss of texture when stored without and with temperature fluctuation ( $\leq 23.88 \pm 1.59$  % and  $\leq 42.67 \pm 3.27$  %, respectively), these concentrations of cryoprotective compounds were considered the optimized condition.

The results showed that compared to the control sample (sample without compounds impregnation) this treatment (2.20% w/w GH and 2.20% w/w CNF) resulted in less loss of cellular fluids when stored without ( $\leq 19.72 \pm 0.54$ %) and with ( $\leq 28.82 \pm 4.17$  %) temperature fluctuation. Better quality in the microstructure of this food matrix was also observed because the cell diameters were larger. For samples with and without temperature fluctuation, diameters greater than  $78.23 \pm 16.47$   $\mu\text{m}$  and  $71.01 \pm 8.58$   $\mu\text{m}$ , respectively, were observed. Furthermore, the impregnated samples presented a more attractive color, due to the lower browning index ( $BI \leq 6.48 \pm 0.98$ ) compared to the control ( $15.43 \pm 2.87$ ). Thus, when applied under ideal conditions, these compounds can exhibit effective cryoprotective activity.

#### Acknowledgements

The authors thank the Central of Analysis and Chemical Prospecting and the Laboratory of Electronic Microscopy and Ultrastructural Analysis of the Federal University of Lavras, as well as Finep, Fapemig, Capes and CNPq for supplying the equipment and technical support for experiments involving Fourier transform infrared spectroscopy and electron microscopy analyses. The authors would also like to thank Embrapa Agroindústria de Alimentos for the Differential scanning calorimetry analysis.

## **Funding**

The authors thank the financial support provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## **Data availability**

All data generated or analyzed during this study are included in this manuscript.

## **Author Contribution**

Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira: Conceptualization, Data curation, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft; Larissa Carolina de Moraes: Conceptualization, Investigation, Writing - Original Draft; Carine Setter: Methodology, Resources; Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo: Resources; Carlos Wanderlei Piler Carvalho: Methodology, Resources; Jaime Vilela de Resende: Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision, Writing - Review & Editing;

## **DECLARATIONS**

**Conflicts of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## **DECLARATION OF COMPETING INTEREST**

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## **REFERENCES**

- Betoret, E., Betoret, N., Rocculi, P., & Dalla Rosa, M. (2015). Strategies to improve food functionality: Structure-property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 46(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.006>
- Bilbao-Sainz, C., Zhao, Y., Takeoka, G., Williams, T., Wood, D., Chiou, B. Sen, et al. (2020).

- Effect of isochoric freezing on quality aspects of minimally processed potatoes. *Journal of Food Science*, 85(9), 2656–2664. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15377>
- Bkhairia, I., Mhamdi, S., Jridi, M., & Nasri, M. (2016). New acidic proteases from *Liza aurata* viscera: Characterization and application in gelatin production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 533–542.
- Bryan, M. A., Brauner, J. W., Anderle, G., Flach, C. R., Brodsky, B., & Mendelsohn, R. (2007). FTIR studies of collagen model peptides: Complementary experimental and simulation approaches to conformation and unfolding. *Journal of the American Chemical Society*, 129(25), 7877–7884. <https://doi.org/10.1021/ja071154i>
- Cai, L., Nian, L., Zhao, G., Zhang, Y., Sha, L., & Li, J. (2019). Effect of Herring Antifreeze Protein Combined with Chitosan Magnetic Nanoparticles on Quality Attributes in Red Sea Bream (*Pagrosomus major*). *Food and Bioprocess Technology*, 12(3), 409–421. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2220-4>
- Cao, W., Shi, L., Hao, G., Chen, J., & Weng, W. (2021). Effect of molecular weight on the emulsion properties of microfluidized gelatin hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 111(November 2019), 106267. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106267>
- Chen, X., Li, X., Yang, F., Wu, J., Huang, D., Huang, J., & Wang, S. (2022). Effects and mechanism of antifreeze peptides from silver carp scales on the freeze-thaw stability of frozen surimi. *Food Chemistry*, 396(March), 133717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133717>
- Colla, L. M., & Prentice-Hernández, C. (2003). Congelamento e Descongelação - Sua Influência sobre os Alimentos. *Vetor*, 13, 53–66.
- Damodaran, S. (2007). Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10918–10923. <https://doi.org/10.1021/jf0724670>

- Davies, P. L. (2014). Ice-binding proteins: A remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(11), 548–555.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.09.005>
- Donmez, D., Pinho, L., Patel, B., Desam, P., & Campanella, O. H. (2021). Characterization of starch–water interactions and their effects on two key functional properties: starch gelatinization and retrogradation. *Current Opinion in Food Science*, 39, 103–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.018>
- Elavarasan, K., Shamasundar, B. A., Badii, F., & Howell, N. (2016). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*). *Food Chemistry*, 206, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.047>
- Gallego-Castillo, S., & Ayala-Aponte, A. A. (2018). Changes in physical properties of sweet potato due to effects of thermal pre-treatments for puree production. *DYNA (Colombia)*, 85(207), 135–142. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n207.72876>
- James, C., Purnell, G., & James, S. J. (2015). A Review of Novel and Innovative Food Freezing Technologies. *Food and Bioprocess Technology*, 8(8), 1616–1634.  
<https://doi.org/10.1007/s11947-015-1542-8>
- Jha, P. K., Chevallier, S., Xanthakis, E., Jury, V., & Le-Bail, A. (2020). Effect of innovative microwave assisted freezing (MAF) on the quality attributes of apples and potatoes. *Food Chemistry*, 309(May 2019), 125594.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125594>
- Kiani, H., & Sun, D. W. (2011). Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 22(8), 407–426.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.04.011>
- Kumar, P. K., Bhunia, K., Tang, J., Rasco, B. A., Takhar, P. S., & Sablani, S. S. (2018).

- Thermal transition and thermo-physical properties of potato (*Solanum tuberosum* L.) var. Russet brown. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*(3), 1572–1580.  
<https://doi.org/10.1007/s11694-018-9772-x>
- Kumar, P. K., Bhunia, K., Tang, J., Rasco, B. A., Takhar, P. S., & Sablani, S. S. (2019). State/phase transitions induced by ice recrystallization and its influence on the mechanical properties of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) var. Russet Brown. *Journal of Food Engineering*, *251*, 45–56.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.002>
- Li, B., & Sun, D. W. (2002). Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing of potatoes. *Journal of Food Engineering*, *55*(3), 277–282.  
[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00102-4)
- Li, M., Dia, V. P., & Wu, T. (2021). Ice recrystallization inhibition effect of cellulose nanocrystals: Influence of sucrose concentration. *Food Hydrocolloids*, *121*(March), 107011. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107011>
- Li, T., Li, M., Dia, V. P., Lenaghan, S., Zhong, Q., & Wu, T. (2020). Electrosterically stabilized cellulose nanocrystals demonstrate ice recrystallization inhibition and cryoprotection activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 2378–2386. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.143>
- Li, T., Zhao, Y., Zhong, Q., & Wu, T. (2019). Inhibiting Ice Recrystallization by Nanocelluloses. *Biomacromolecules*, *20*(4), 1667–1674.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00027>
- Li, Z., Wang, Q., Li, S., Chang, Y., Zheng, X., Cao, H., & Zheng, Y. (2022). Usage of nanocrystalline cellulose as a novel cryoprotective substance for the *Nemipterus virgatus* surimi during frozen storage. *Food Chemistry: X*, *16*(April), 100506.  
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100506>

- Limpisophon, K., Iguchi, H., Tanaka, M., Suzuki, T., Okazaki, E., Saito, T., et al. (2015). Cryoprotective effect of gelatin hydrolysate from shark skin on denaturation of frozen surimi compared with that from bovine skin. *Fisheries Science*, *81*(2), 383–392.  
<https://doi.org/10.1007/s12562-014-0844-5>
- Lin, J., Hong, H., Zhang, L., Zhang, C., & Luo, Y. (2019). Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in preventing denaturation of frozen surimi. *Food Chemistry*, *298*(May), 124868.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.142>
- Liu, C., Grimi, N., Bals, O., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2021). Effects of pulsed electric fields and preliminary vacuum drying on freezing assisted processes in potato tissue. *Food and Bioproducts Processing*, *125*, 126–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.11.002>
- Lv, L. C., Huang, Q. Y., Ding, W., Xiao, X. H., Zhang, H. Y., & Xiong, L. X. (2019). Fish gelatin: The novel potential applications. *Journal of Functional Foods*, *63*(January).  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103581>
- Melo, A. E. da S. C., Sousa, F. S. R. de, Santos-Silva, A. M. dos, Nascimento, E. G. do, Fernandes-Pedrosa, M. F., Medeiros, C. A. de C. X., & Silva-Junior, A. A. da. (2023). Immobilization of Papain in Chitosan Membranes as a Potential Alternative for Skin Wounds. *Pharmaceutics*, *15*(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122649>
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, *86*(3), 325–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.038>
- Nahr, F. K., Mokarram, R. R., Hejazi, M. A., Ghanbarzadeh, B., Khiyabani, M. S., & Benis, K. Z. (2015). Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance

- the viability of freeze dried *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. *Lwt*, *64*(1), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.004>
- Nechporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2016). Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, *93*, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>
- Nian, L., Cao, A., Cai, L., Ji, H., & Liu, S. (2019). Effect of vacuum impregnation of red sea bream (*Pagrosomus major*) with herring AFP combined with CS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles during freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, *291*(November 2018), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.017>
- Nunes, C. A., Freitas, M. P., Pinheiro, A. C. M., & Bastos, S. C. (2012). Chemoface: A novel free user-friendly interface for chemometrics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *23*(11), 2003–2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>
- Otero, L., & Pozo, A. (2022). Effects of the application of static magnetic fields during potato freezing. *Journal of Food Engineering*, *316*, 110838. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110838>
- Perumal, A. B., Nambiar, R. B., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2022). Nanocellulose: Recent trends and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, *127*(January), 107484. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107484>
- Reid, D. S. (1993). Basic physical phenomena in the freezing and thawing of plant and animal tissues. In *Frozen Food Technology* (2nd ed., pp. 1–19). Glasgow: Blackie academic & professional. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3550-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3550-8_1)
- Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2014). *Experimental Design and Process Optimization* (1st ed.). Campinas, Brazil: CRC Press.
- Ruiz-Rodriguez, L., Loche, P., Hansen, L. T., Netz, R. R., Fratzl, P., Schneck, E., et al. (2021). Sequence-specific response of collagen-mimetic peptides to osmotic pressure.

- MRS Bulletin*, 46(10), 889–901. <https://doi.org/10.1557/s43577-021-00138-9>
- Santarelli, V., Neri, L., Moschetti, R., Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Massantini, R., & Pittia, P. (2021). Combined Use of Blanching and Vacuum Impregnation with Trehalose and Green Tea Extract as Pre-treatment to Improve the Quality and Stability of Frozen Carrots. *Food and Bioprocess Technology*, 14(7), 1326–1340. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02637-8>
- Setter, C., Mascarenhas, A. R. P., Dias, M. C., de Oliveira Meira, A. C. F., da Silva Carvalho, N. T., Lorenço, M. S., et al. (2023). Surface modification of cellulosic nanofibrils by spray drying: Drying yield and microstructural, thermal and chemical characterization. *Industrial Crops and Products*, 201(May). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116899>
- Sharma, C., Jayanty, S. S., Chambers, E., & Talavera, M. (2020). Segmentation of potato consumers based on sensory and attitudinal aspects. *Foods*, 9(2), 161. <https://doi.org/10.3390/foods9020161>
- Singh, J., & Kaur, L. (2016). *Advances in Potato Chemistry and Technology*. *Advances in Potato Chemistry and Technology* (2nd ed.). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128000021000078>
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. *Polymer Fractionation* (2nd ed.). Michigan: Freeman Press. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4832-3245-4.50016-9>
- Sultanbawa, Y., & Li-Chan, E. C. Y. (1998). Cryoprotective effects of sugar and polyol blends in ling cod surimi during frozen storage. *Food Research International*, 31(2), 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00063-5)
- Tan, M., Ding, Z., Yang, D., & Xie, J. (2022). The quality properties of frozen large yellow croaker fillets during temperature fluctuation cycles: improvement by cellobiose and carboxylated cellulose nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*,

- 194(November 2021), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.093>
- Ullah, J., Takhar, P. S., & Sablani, S. S. (2014). Effect of temperature fluctuations on ice-crystal growth in frozen potatoes during storage. *Lwt*, *59*(2P1), 1186–1190. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.018>
- Welti, A., Stetzer, O., & Lohmann, U. (2009). Atmospheric Chemistry and Physics Influence of particle size on the ice nucleating ability of mineral dusts. *Atmos. Chem. Phys*, *9*, 6705–6715. [www.atmos-chem-phys.net/9/6705/2009/](http://www.atmos-chem-phys.net/9/6705/2009/)
- Yuan, H. N., Lv, J. M., Gong, J. Y., Xiao, G. N., Zhu, R. Y., Li, L., & Qiu, J. N. (2018). Secondary structures and their effects on antioxidant capacity of antioxidant peptides in yogurt. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 2176–2180. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1501700>
- Zhang, L., Li, Q., Hong, H., & Luo, Y. (2020). Prevention of protein oxidation and enhancement of gel properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi by addition of protein hydrolysates derived from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, *316*(December 2019), 126343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126343>
- Zhang, T., Zhao, R., Liu, W., Liu, Q., Zhang, L., & Hu, H. (2022a). Dynamic changes of potato characteristics during traditional freeze-thaw dehydration processing. *Food Chemistry*, *389*(April), 133069. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133069>
- Zhang, X., Zhang, Y., Dong, Y., Ding, H., Chen, K., Lu, T., & Dai, Z. (2022b). Study on the mechanism of protein hydrolysate delaying quality deterioration of frozen surimi. *Lwt*, *167*(April), 113767. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113767>
- Zhang, Y., Tu, D., Shen, Q., & Dai, Z. (2019). Fish scale valorization by hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for gelatin hydrolysate production. *Molecules*, *24*(16), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24162998>

- Zhao, A., Shi, P., Yang, R., Gu, Z., Jiang, D., & Wang, P. (2022). Isolation of novel wheat bran antifreeze polysaccharides and the cryoprotective effect on frozen dough quality. *Food Hydrocolloids*, *125*(December 2021), 107446.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107446>
- Zhu, S., Yu, J., Chen, X., Zhang, Q., Cai, X., Ding, Y., et al. (2021). Dual cryoprotective strategies for ice-binding and stabilizing of frozen seafood: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *111*(August 2020), 223–232.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.069>
- Zhu, Zhou, Q., & Sun, D. W. (2019). Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, *90*(April), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.012>

**ARTIGO 2****APLICAÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE COMO CRIOPROTETOR NO  
ARMAZENAMENTO CONGELADO DE *SURIMI-LIKE* DE FRANGO**

Normas do periódico: Food Chemistry

ISSN: 1873-7072

(versão preliminar)

Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira<sup>a</sup>, Larissa Carolina de Moraes<sup>a</sup>, Bruna Fernandes  
Andrade<sup>a</sup>, Carine Setter<sup>b</sup>, Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo<sup>a</sup>, Carlos Wanderlei Piler Carvalho<sup>c</sup>,  
Eduardo Mendes Ramos<sup>a</sup>, Jaime Vilela de Resende<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brazil.*

<sup>b</sup>*Federal University of Lavras, Department of Engineering, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brazil.*

<sup>c</sup>*Embrapa Food Technology, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 23020-470, Brazil.*

\*Correspondence to: Jaime Vilela de Resende, Department of Food Science, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brazil, (E-mail: [jvresende@ufla.br](mailto:jvresende@ufla.br))

## RESUMO

A aplicação de nanofibras de celulose (CNF) como crioprotetor em alimentos congelados é pouco explorada. Neste contexto, este estudo teve como objetivo investigar a ação crioprotetora de CNF (2, 4 e 6 % m/m) em *surimi-like* de frango, obtido a partir da carne mecanicamente separada de frango, durante o armazenamento congelado (5 e 60 dias) sob flutuação de temperatura. O *surimi-like* sem agentes de criopreservação foi mais suscetível à oxidação proteica, devido à recristalização do gelo. A adição de 2 % de CNF atenuou a oxidação das proteínas miofibrilares na mesma proporção que os crioprotetores comerciais (sacarose, sorbitol e tripolifosfato de sódio). O *surimi-like* contendo 2 % de CNF possuía alta concentração de proteínas solúveis em sal ( $9,62 \pm 1,13$  mg/g), menor carbonilação das proteínas ( $1,85 \pm 0,27$  nmol/mg), poucas alterações na estrutura secundárias das proteínas miofibrilares, reduzidos percentuais de perdas de água por descongelamento e cocção ( $30,24 \pm 2,20$  %) e géis com elevada capacidade de retenção de água ( $86,78 \pm 1,56$  %) e microestrutura mais homogênea e menos porosa em relação ao controle (sem crioprotetores) e aos demais tratamentos contendo CNF. A eficácia crioprotetora da CNF foi evidente em *surimi-like*, sendo um composto alternativo aos crioprotetores comerciais.

**Palavras-chave:** Carne mecanicamente separada de frango; Oxidação proteica; Crioproteção; Recristalização de gelo.

## 1. INTRODUÇÃO

A carne de frango mecanicamente separada (MSCM) é um subproduto proveniente da desossa mecânica de carcaças inteiras, pescoços, dorsos e ossos após a conclusão da desossa manual de frangos. Durante este processo ocorre a ruptura celular dos tecidos, desnaturação de proteínas, aumento do teor de lipídeos e grupo heme e perda de propriedades mecânicas, devido à desestruturação das fibras musculares (Hui et al., 2012). Embora esta matéria-prima apresente excelentes características nutricionais, características tecnológicas desejáveis e um custo comparativamente baixo (Püssa et al., 2009) seu processo de obtenção a torna mais susceptível à oxidação lipídica e ao crescimento microbológico.

A elevada concentração de hemoproteínas, íons de cálcio e íons metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ ), devido a presença de medula óssea, facilita o processo de oxidação lipídica. Além disso, a ruptura celular gera uma rápida ativação de enzimas hidrolíticas que atuam liberando ácidos graxos poliinsaturados que são altamente sensíveis a oxidação (Püssa et al., 2009; Spitteller et al., 2001). Já o crescimento microbológico é favorecido graças à maior área superficial da carne em contato com o meio externo, à liberação de fluidos celulares ricos em nutrientes, ao ligeiro aquecimento gerado na desossa mecânica e ao extenso manuseio desta matéria-prima (Hui et al., 2012). Visando superar estas características indesejáveis, o processamento da MSCM em produto tipo *surimi* é uma técnica promissora que permite agregar valor a esta matéria-prima (Massingue et al., 2022), aumentar sua vida útil e aplica-la posteriormente na fabricação de outros produtos cárneos.

Após as etapas de lavagens da MSCM para obtenção do produto tipo *surimi*, o armazenamento prolongado congelado é uma etapa crítica do processamento desse produto. Esta técnica de conservação pode prejudicar a qualidade das proteínas miofibrilares, pois o crescimento dos cristais de gelo causa remoção da água celular e desnaturação proteica (Ramadhan et al., 2012). Também ocorre agregação desse grupo de proteínas, porque no congelamento ocorre um desdobramento das proteínas miofibrilares de modo que os aminoácidos apolares são expostos e se tornam disponíveis para formar interações hidrofóbicas com outras regiões hidrofóbicas próximas. O resultado é que a massa proteica apresenta mudanças de textura, perda da capacidade de gelificação e retenção de água (Campo-Deaño et al., 2009). Além disso, as proteínas se tornam mais duras, secas e fibrosas (Walayat et al., 2020). Por fim, ainda pode ocorrer oxidação proteica de modo que o grupo sulfidrila presente nas proteínas sejam oxidados e formem ligações dissulfeto, resultando em mudanças estruturais significativas na rede proteica (Lin et al., 2019). Destaca-se também que ao longo da cadeia do

frio deste produto podem ocorrer flutuações de temperatura que irão ocasionar a recristalização de gelo, formando cristais de gelo maiores em detrimento dos cristais de gelo menores, de modo que os danos estruturais podem ser ainda maiores (Griffith & Ewart, 1995; Zhu et al., 2019).

Uma forma de minimizar os impactos negativos do congelamento e da recristalização do gelo sobre as proteínas do *surimi* é adicionar substâncias crioprotetoras na massa antes de realizar o congelamento. Uma classe de crioprotetores em ascensão é a de crioprotetores de função dupla. Estas substâncias, atuam estabilizando componentes do produto e inibindo a formação de grandes cristais de gelo durante a recristalização, os materiais em nanoescala pertencem a esta classe (Zhu et al., 2021).

A nanofibra de celulose (CNF) é um nanomaterial formado por feixes de fibrilas obtidas pela desintegração mecânica de biomassa lignocelulósica. Este polímero é formado por unidades repetidas de anidrocetose. Estruturalmente é um material semicristalino composto por regiões amorfas (desordenadas) e cristalinas (ordenadas), que apresenta um diâmetro variando entre 10 e 100 nm (Nechyporchuk et al., 2016). Atualmente, a nanocelulose é usada como emulsificante, espessante, estabilizante, substituto de gordura, materiais de cobertura de alimentos e agentes carreadores de compostos bioativos (Alzate-Arbeláez et al., 2019; Perumal et al., 2022). A crescente demanda da indústria de alimentos por este aditivo alimentar têm impulsionado muitas pesquisas. Entretanto, há poucos estudos que relatam o emprego de nanofibras de celulose com função crioprotetora. Neste contexto, este trabalho objetivou aplicar CNF como crioprotetores em *surimi-like* de frango armazenado sob congelamento com flutuação de temperatura e avaliar o efeito deste aditivo na oxidação lipídica e proteica, na estrutura secundária das proteínas miofibrilares e na capacidade de retenção de água e microestrutura do gel de *surimi-like*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

A carne de frango mecanicamente separada (MSCM) foi adquirida da empresa Atalaia Alimentos (Prados, Minas Gerais, Brasil). Polpa comercial kraft branqueada de *Pinus* sp. foi utilizada na elaboração das nanofibras de celulose (CNF) e foi cedida pelo laboratório de nanotecnologia florestal da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. O ácido clorídrico, ureia, ácido tricloroacético e álcool etílico (95 %) foram adquiridos da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil). O cloreto de sódio, albumina sérica bovina ( $\geq 98$  %), reagente de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) ( $\geq 98$  %), 2,4-dinitrofenilhidrazina (97 %),

dodecilsulfato de sódio, acrilamida (99 %), N, N'-metil-bis-acrilamida (99 %), N, N, N, N'-tetrametil etilenodiamina (99 %) foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Todos os demais reagentes descritos na metodologia foram todos de grau analítico.

## 2.2 Síntese das CNF

Suspensões celulósicas com concentração de 2 % m/m foram fibriladas mecanicamente em um moinho microfibrilador Super Masscoloider (Masuko®, Sangyo – Modelo MKCA6-2, Japão). A polpa de *Pinus* sp. foi submetida a 5 passagens no moinho com rotação de 1.500 rpm. A distância entre os discos de pedras foi de 10 µm e o ajuste foi realizado gradualmente observando o aumento da viscosidade da suspensão. O processo resultou em uma pasta de nanofibras de celulose contendo um percentual de sólidos de  $1,23 \pm 0,15$  % (Meira et al., 2024).

## 2.3 Morfologia e distribuição de tamanho das CNF

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para verificar a estrutura e morfologia das nanofibras de celulose. A pasta de nanofibras de celulose foi diluída em água deionizada perfazendo uma concentração final de 0,001 % m/v e a mistura foi agitada vigorosamente. Posteriormente, uma gota da solução foi inserida em suporte (*stub*). As amostras foram secas naturalmente, metalizadas com ouro e examinadas usando um microscópio eletrônico de varredura de ultra alta resolução (Tescan-Clara, Czech Republic) com uma voltagem de aceleração de 15 kV. O software ImageJ foi usado para medir os diâmetros das nanofibras de celulose. Para isso, cinquenta medições foram realizadas.

## 2.4 Análise térmica da suspensão de CNF

O ponto de super-resfriamento e o teor de água congelável da pasta de CNF foram verificados por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Uma amostra de aproximadamente 10 mg de pasta CNF foi inserida em uma panela de alumínio selada, inserida em um analisador da TA Instruments (Mod. DSC Q200, EUA) e congelada até  $-30$  °C a uma taxa de varredura constante (1 °C/min), a fim de verificar o ponto de super-resfriamento. Em seguida, a amostra foi aquecida a 10 °C na mesma taxa de varredura até completo derretimento dos cristais de gelo e o ponto de fusão foi registrado. Pelas curvas do DSC também foi possível calcular o teor de água congelável ( $F_W$ ) pela Equação 1 (Tan et al., 2022).

$$F_w (\%) = \left( \frac{\Delta H_m}{\Delta H_w} \right) \times 100 \quad (1)$$

em que,  $\Delta H_w$  é a entalpia endotérmica da água pura a 0 °C (333,88 J/g) e  $\Delta H_m$  é a entalpia de fusão da amostra (J/g).

## 2.5 Produção do *surimi-like* de frango

A produção de *surimi-like* foi realizada a partir da MSCM empregando a condição otimizada reportada por Cortez-Vega et al. (2015). Inicialmente, foi realizada a lavagem da MSCM em 3 ciclos utilizando em cada ciclo uma proporção de solução de lavagem para MSCM de 4:1 (m/m). Na primeira e segunda lavagens foi utilizado solução de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0,5 % (m/v) e na terceira lavagem foi usado solução de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) 0,3 % (m/v). As lavagens foram realizadas a 7 °C por 10 min, a uma agitação constante de 240 rpm por meio de um agitador mecânico (IKA modelo RW 20, São Paulo, Brasil). Após cada ciclo a camada superior de gordura foi removida manualmente com uma colher e a mistura foi prensada manualmente em tecido organza visando remover o excesso de água do concentrado de carne (Massingue et al., 2021). O processo de produção foi realizado em triplicata. A cada produção as massas de MSCM (g) e do *surimi-like* (g) foram pesadas e o rendimento (%) foi calculado pela Equação 2.

$$\text{Rendimento surimi – like (\%)} = 100 \times \frac{\text{Massa surimi – like}}{\text{Massa da MSCM}} \quad (2)$$

A massa final de *surimi-like* obtida a cada processo produtivo foi dividida em cinco tratamentos, sendo que em três foram adicionadas CNF na proporção de 2 % m/m (2% CNF), 4 % m/m (4 % CNF) e 6 % m/m (6 % CNF) (Li et al., 2022). Um tratamento, denominado controle positivo (C1) foi adicionado de uma mistura de crioprotetores contendo 4 % m/m de sacarose, 4 % m/m de sorbitol e 0,2 % m/m de tripolifosfato de sódio (Walayat et al., 2020), em relação ao *surimi-like*. O quinto tratamento, denominado de controle negativo (C2), foi isento de agentes crioprotetores. Os tratamentos foram moldados em formato cilíndrico (20 mm de diâmetro e 30 mm de altura) e posteriormente embaladas em embalagens de polietileno, sem vácuo e congeladas à -25 °C.

## 2.6 Composição química

As análises de umidade, gordura, proteína, colágeno e minerais da MSCM e do *surimi-like* foram realizadas por infravermelho próximo (método AOAC: 2007-04) em aproximadamente 80 g de amostra, utilizando o aparelho FoodScan™ (FOSS, Hillerod, Dinamarca).

## 2.7 Congelamento e descongelamento monitorados

As curvas de temperatura das amostras de *surimi-like* de frango foram obtidas inserindo um sensor de temperatura (termopar tipo T de cobre/constantan, 1,5 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento) no centro geométrico das amostras. Os sensores foram conectados a um sistema de condicionamento de sinais (National Instruments - Modelo SCXI - Hungria) e as medições de temperatura foram obtidas em intervalos de 10 segundos usando o software LabVIEW 8.5.

## 2.8 Armazenamento congelado com flutuação de temperatura

As amostras de *surimi-like* foram submetidas ao armazenamento congelado com flutuação de temperatura por 60 dias. As amostras embaladas e congeladas passaram por 9 ciclos térmicos. Cada ciclo consistiu no armazenamento das amostras durante 144 h, em freezer horizontal a -25 °C, e em seguida foram transferidas para um freezer a -7 °C por 24 h. As alterações de temperaturas foram realizadas ao longo de todo o período da estocagem (60 dias).

## 2.9 Análises de qualidade do *surimi-like*

As amostras de *surimi-like* foram submetidas a análise de qualidade após 5 e 60 dias de armazenamento com flutuação de temperatura.

### 2.9.1 Perda de fluidos por descongelamento

A perda de água por descongelamento das amostras de *surimi-like* foi calculada pela Equação 3. A massa das amostras de *surimi-like* recém preparadas e após descongelamento a 5

°C por 12 h seguido por secagem de sua superfície com papel absorvente, foram mensuradas com auxílio de uma balança analítica (Shimadzu, ATX 224, Japão).

$$m_P(\%) = \frac{m_C - m_D}{m_C} \times 100 \quad (3)$$

em que  $m_C$  é a massa do *surimi-like* recém preparado (g),  $m_D$  é a massa do *surimi-like* após o descongelamento e secagem (g) e  $m_P$  é a porcentagem de água perdida durante o descongelamento (%).

### 2.9.2 Oxidação lipídica

A avaliação da oxidação lipídica foi realizada pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (índice de TBARS), conforme metodologia proposta por Andrade et al. (2024), com algumas modificações. Aproximadamente 5 g de amostra foram homogeneizadas (Turratex TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil) com 14 mL de água e 1 mL de BHT (10 % v/v) a 5000 rpm por 30 s. Posteriormente, foi feita a centrifugação da amostra a 2000 x g por 5 min. Em seguida, 2 mL do sobrenadante foram coletados, adicionados de 2 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,288 % m/v (preparado em ácido perclórico 7,2 % v/v) e misturados em vórtex. A mistura foi aquecida em banho termostático a 90 °C por 30 min. As amostras foram resfriadas em banho gelado, por 10 min, até temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 532 nm (Genesys 10 UV; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Uma curva padrão foi preparada usando 1, 1, 3, 3 - tetraetoxipropano (TEP) ( $y = 0,205x$ ;  $R^2 = 0,993$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  malonaldeído (MDA)/g amostra.

### 2.9.3 Extração e avaliação das proteínas solúveis em sal

A extração das proteínas solúveis em sal (proteínas miofibrilares) do *surimi-like* foi realizada conforme procedimento descrito por Chen et al. (2021). Resumidamente, foram misturados *surimi-like* e tampão (0,05 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) na proporção 1:4 (m/v), respectivamente, e a mistura foi homogeneizada em Ultra turrax (Tecnal TE102, Brasil) por 1 min a 4.000 rpm. Em seguida, foi feita a centrifugação da mistura a 4677 x g por 10 min (Splabor, sp-701, Brasil), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi coletado. Estas etapas foram repetidas três vezes. Após realização das três lavagens, o precipitado foi misturado a um tampão com maior teor salino (0,6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) em proporção 1:4 (m/v),

respectivamente, homogeneizado por 2 min e deixado em repouso por 30 min a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 4677 x g por 10 min e o sobrenadante contendo as proteínas miofibrilares foi coletado e submetido à análise de Bradford (Bradford, 1976). Uma curva padrão ( $y=0,754x - 0,026$ ;  $R^2 = 0,992$ ) utilizando proteína albumina sérica bovina como padrão foi utilizada para determinar a concentração de proteínas e o teor de proteínas solúveis em sal foi calculado pela Equação 4.

$$\text{Teor de proteínas solúveis em sal} \left( \frac{mg}{g} \right) = \frac{C \times V}{m} \quad (4)$$

em que  $C$  é a concentração de proteínas (mg/mL) obtidas pelo método de Bradford,  $V$  é o volume de solução de proteínas miofibrilares obtidas após centrifugação (mL) e  $m$  é a massa de *surimi-like* usado para extrair as proteínas miofibrilares (2,5 g).

A solução de proteínas solúveis em sal (proteínas miofibrilares) extraídas também foi usada para realizar as análises de hidrofobicidade, determinação dos teores de sulfidril e carbonila, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e eletroforese.

#### 2.9.4 Hidrofobicidade da superfície

A determinação da desnaturação das proteínas de *surimi-like* foi feito analisando a hidrofobicidade da superfície das proteínas miofibrilares usando o cromóforo azul de bromofenol (BPB) (Chelh et al., 2006). Um mL de solução de proteínas miofibrilares foi misturado com 200 µL de BPB (1 mg/mL, preparado em água destilada), agitado por 2 min e centrifugado a 4677 x g por 10 min (Splabor, sp-701, Brasil). A absorbância do sobrenadante (diluído em tampão na proporção de 1/10 v/v) foi medida a 595 nm. O tampão composto por 0,6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 foi utilizado para realizar a diluição. Uma amostra sem proteínas miofibrilares composta por 200 µL de solução de BPB e 1 ml de tampão foi utilizada como controle. A hidrofobicidade da superfície das proteínas miofibrilares foi expressa como a quantidade de BPB ligada as proteínas (Equação 5).

$$\text{BPB ligado} (\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{proteínas}}) = 200 \mu\text{g} \times \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) \times V_{\text{proteína}}}{(A_{\text{controle}}) \times C_{\text{proteína}}} \quad (5)$$

em que  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle,  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância da amostra analisada,  $C_{\text{proteína}}$  é a concentração de proteína na solução (mg/mL) e  $V_{\text{proteína}}$  é o volume da solução de proteína utilizada na análise (1 mL).

### 2.9.5 Determinação do teor de sulfidril (SH)

A concentração de grupos sulfidril nas proteínas miofibrilares do *surimi-like* foi determinado usando o reagente de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DNTB), com modificações (Ellman, 1959). Inicialmente, 0,5 mL de solução de proteínas miofibrilares foi diluída em 4,5 mL de tampão A (8 M de ureia; 3 mM de ácido etilenodiaminotetracético, - EDTA; 1% de dodecil sulfato de sódio, SDS; e 0,2 M de Tris-HCl, pH 8,0). A mistura foi homogeneizada em vórtex, em seguida, foram retirados 4 mL dessa mistura e adicionados de 0,5 mL de tampão B (10 mM 5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), DTNB; e 0,2 M Tris-HCl com pH 8,0). A mistura foi homogeneizada em vórtex, incubada a 40 °C por 25 min em banho termostático, resfriada à temperatura ambiente e determinada a absorvância a 412 nm em espectrofotômetro UV/visível (NI, 2000 UV, Nova instruments, Brasil). No grupo controle foi utilizado tampão (0,6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) em substituição à solução de proteínas miofibrilares. A concentração de grupos sulfidril foi calculada pela Equação (6).

$$\text{Concentração de grupo sulfidril} \left( \frac{\text{mol}}{10^5 \text{g}} \right) = \frac{(A \times D)}{(C \times B)} \quad (6)$$

em que  $A$  é a absorvância da mistura,  $B$  é a concentração da proteína determinado pelo método de Bradford (mg/mL),  $C$  é o coeficiente de extinção molar ( $13.600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ ) e  $D$  é a razão de diluição (1).

### 2.9.6 Determinação da concentração de carbonila

A concentração de carbonila foi quantificada pelo método de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) conforme descrito por Lin et al. (2019), com alterações. Um mL de solução de proteínas miofibrilares padronizada em uma concentração de 2 mg/mL foi adicionada de 1 mL de DNPH (10 mM) e incubado no escuro à temperatura ambiente por 1 h. Uma alíquota composta por 1 mL de tampão (0,6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) foi utilizada como controle. Em seguida, a mistura foi precipitada com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 20 % m/m e centrifugada a 4677 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1 mL de solução de etanol/acetato de etila (1:1, v/v) por três vezes para remover DNPH não reagido. O sedimento resultante das lavagens foi adicionado de 3 mL de hidrocloreto de guanidina 6 M (preparado em HCl 2 M) e então incubado a 37 °C por 15 min. A solução

resultante foi centrifugada 4677 x g por 10 min e o sobrenadante foi recolhido para leitura em espectrofotômetro UV/visível. O teor de carbonila, expresso em nmol/mg de proteína foi calculado de acordo com a absorbância a 370 nm e um coeficiente de extinção molar de 22.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## **2.10 Análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

As soluções de proteínas miofibrilares de *surimi-like* foram congelados em Ultra Freezer (modelo CL 120-86V, Coldlab, Brasil) à -75 °C e liofilizados a -45 °C com pressão de vácuo de 0,1919 mbar em um liofilizador (Terroni, model LS6000, L4KR, Brazil) por 72 h. Os pós resultantes foram submetidos à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em espectrofotômetro Bruker FTIR (Vertex 70, EUA). Vinte mg de proteína liofilizada foram misturadas com 90 mg de brometo de potássio (KBr) e prensadas em pastilha. A região do infravermelho analisada foi de 4000 cm<sup>-1</sup> a 500 cm<sup>-1</sup> com 64 varreduras e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. A análise quantitativa das estruturas secundárias da proteína miofibrilar foi realizada por meio do software Peak Fit (versão 4.12). As bandas individuais na região de amida I (1600–1700 cm<sup>-1</sup>) foram usadas para calcular os componentes estruturais secundários, incluindo  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$ ,  $\beta$ -volta e bobina aleatória.

## **2.11 Eletroforese (SDS-PAGE)**

A massa molecular das proteínas presentes no *surimi-like* foi analisada por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida SDS-PAGE, usando um sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad Laboratories, INC., EUA). As soluções de proteínas miofibrilares foram diluídas em tampão desnaturante (contendo dodecilsulfato de sódio, azul de bromofenol, glicerol e  $\beta$ -mercaptoetanol), de modo que a concentração final de proteínas foi 1 mg/mL. Em seguida, as suspensões foram aquecidas a 90 °C por 10 min. Alíquotas de 15  $\mu$ L de amostra desnaturada foram injetadas em gel de acrilamida formado por um gel de separação 12 % e um gel de empilhamento de 5 %. O SigmaMaker<sup>TM</sup> (200 kDa a 6,5 kDa; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi utilizado como marcador de peso molecular. A corrida eletroforética foi realizada por 2 h a 100 V e 30 mA.

## 2.12 Preparação do gel de surimi

Os géis de *surimi-like* foram preparados segundo Chen et al. (2022). As amostras de *surimi-like* descongeladas ( $\pm 3,0$  g) foram adicionadas de 2 % m/m de NaCl e homogeneizadas por 3 min. Os *surimi-like* foram novamente moldados em formatos cilíndricos (20 mm de diâmetro e 30 mm de altura) e, em seguida, foram embalados em embalagem de polietileno e selados hermeticamente. Cada tratamento foi aquecido a 40 °C por 30 min, seguido por aquecimento a 90 °C por 30 min em banho termostático. Posteriormente, os géis foram resfriados em água gelada (0 °C) por 15 min e armazenados a 7 °C para análises posteriores.

### 2.12.1 Capacidade de retenção de água (CRA)

A CRA dos géis de *surimi-like* foi avaliada pelo método proposto por Mi et al. (2017). Uma amostra de 5 mm de espessura de géis de *surimi-like* foi pesada, envolvidas por papel de filtro, inseridas em tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 4677 x g por 10 min (Splabor, sp-701, Brasil). Em seguida, as amostras foram removidas e pesadas novamente. A CRA (%) foi calculada pela Equação 7.

$$CRA (\%) = \left( \frac{m_2}{m_1} \right) \times 100 \quad (7)$$

em que  $m_2$  é a massa da amostra após centrifugação (g) e  $m_1$  é a massa da amostra antes da centrifugação (g).

### 2.12.2 Perda de água por cozimento

A perda de água dos géis de *surimi-like* por cozimento foi determinada observando a massa das amostras descongeladas e após o cozimento. As amostras foram descongeladas a 5 °C por 12 h. Em seguida, foi feita uma secagem de suas superfícies com papel toalha e depois elas foram pesadas em balança analítica (Shimadzu, ATX 224, Japão). Após o cozimento, as amostras também foram secas e pesadas novamente. A perda de água por cozimento dos géis de *surimi-like* foi calculada pela Equação 8.

$$m_{Pc}(\%) = \frac{m_D - m_{Co}}{m_D} \times 100 \quad (8)$$

em que  $m_D$  é a massa do *surimi-like* descongelado (g),  $m_{Co}$  é a massa do *surimi-like* após a cocção (g) e  $m_{Pc}$  é a porcentagem de água perdida durante o cozimento (%).

### 2.12.3 Determinação da força do gel e análise de textura

A textura dos géis de *surimi-like* foi avaliada usando a Análise de Perfil de Textura (TPA, TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Os géis em formatos cilíndricos (20 mm de diâmetro e 30 mm de altura) foram submetidos a um teste de compressão com uma sonda cilíndrica de 75 mm de diâmetro com velocidade de compressão de 1 mm/s, a compressão realizada foi de 50 % e o intervalo entre as compressões foi de 1 s. Os dados foram coletados usando o software Texture Expert Exceed, (Stable Micro Systems, v. 2.64, Surrey, Reino Unido). A dureza, coesividade, e mastigabilidade foram medidas. O ensaio mecânico foi realizado em cinco repetições.

### 2.12.4 Microestrutura

Os géis de *surimi-like* foram congelados em Ultra Freezer (modelo CL 120-86V, Coldlab, Brasil) à -75 °C e liofilizados a -45 °C com pressão de vácuo de 0,1919 mbar em um liofilizador (Terroni, model LS6000, L4KR, Brazil) por 72 h. Em seguida, as amostras foram fixadas em suportes (*stubs*), cobertas com ouro e examinadas usando um microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss LEO EVO 40 XVP, Oberkochen, Germany) com uma voltagem de aceleração de 20 kV.

## 2.13 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), seguindo um esquema fatorial 5 (tratamentos) x 2 (tempos), com três repetições. Os fatores e sua interação foram submetidos a análises de variância (ANOVA), considerando um nível de 5 % de probabilidade, e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) utilizando o software Statistica (versão 8). Todos os gráficos foram traçados usando o SigmaPlot (versão 11.0).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do CNF e *surimi-like*

A CNF possui microestrutura de fibrilas longas, individuais e aglomeradas em feixes com diâmetros das fibrilas variando de 20 a 90 nm (Fig. 1a). Fibrilas com maior comprimento são benéficas para a crioproteção, porque tendem a apresentar uma maior atividade de inibição da recristalização do gelo (Li et al., 2020).

O termograma da pasta de CNF empregada na elaboração do *surimi-like* obtido pela análise de DSC está ilustrado na Fig. 1b. No resfriamento da amostra, a curva mostrou um pico referente à nucleação do gelo e o ponto de super-resfriamento da amostra. No processo de aquecimento, o pico referente a fusão da amostra foi observado (-0,51 °C). A pasta de CNF apresentou uma baixa temperatura de super-resfriamento (-20,85 °C) apontando limitações na formação dos cristais de gelo (Meira et al., 2024). Com relação à água pura que possui entalpia de fusão de 333,88 J/g, a pasta de CNF exibiu uma entalpia de 299,20 J/g, que é um valor inferior, resultando em um conteúdo de água congelável de 89,61 %. Este comportamento é explicado pela interação das áreas hidrofílicas das CNF com a água por ligações de hidrogênio, impactando negativamente na formação de cristais de gelo (Meira et al., 2024; Tan et al., 2022). Portanto, estas fibrilas adicionadas em alimentos congelados podem interagir com a água líquida oriunda do derretimento de pequenos cristais de gelo durante o processo de flutuação de temperatura, diminuindo a incidência de grandes cristais e minimizando, assim, os danos indesejados ocasionados pela recristalização do gelo.

O *surimi-like* de frango apresentou um baixo rendimento ( $8,95 \pm 1,40$  %). As amostras de MSCM e *surimi-like* possuíam 67,05 % e 74,09 % de umidade, 15,54 % e 6,22 % de gordura, 13,71 % e 15,91 % de proteínas, 0,15 % e 1,63 % de colágeno e 3,70 % e 3,78 % de minerais, respectivamente. Os ciclos de lavagem da MSCM promoveram uma redução considerável do teor de gordura, bem como a remoção de pigmentos (Fig. 1c). Os teores de proteína, gordura e mineral do *surimi-like* de MSCM foram superiores aos encontrados por Cortez-Vega et al. (2015) e o teor de umidade e o rendimento foram inferiores aos obtidos por estes autores. O percentual de colágeno foi superior ao relatado por Jin et al. (2008) para *surimi-like* de peito de frango (0,149 %). As distinções entre a presente pesquisa e os demais relatos bibliográficos são atribuídas às divergências dos parâmetros de qualidade da carne utilizada na elaboração do produto *surimi-like*.

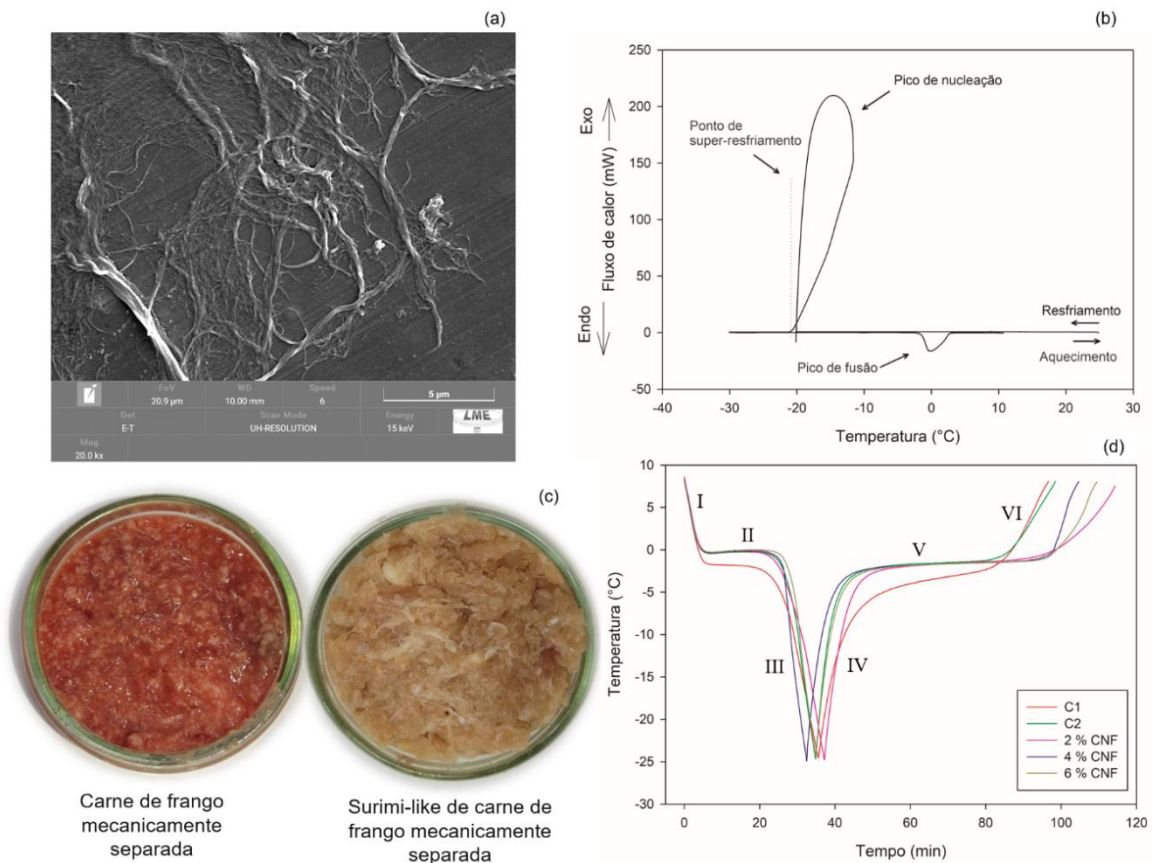


Fig. 1 – (a) Micrografia eletrônica de varredura com ampliação de 20000x das CNF; (b) Curva de calorimetria diferencial de varredura de congelamento ( $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) e fusão ( $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) da pasta de CNF; (c) MSCM e *surimi-like* de MSCM; (d) Curva de congelamento e descongelamento de *surimi-like* de MSCM com diferentes concentrações de crioprotetor. MSCM: carne de frango mecanicamente separada; CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.

Podem ser observadas na Fig. 1d as curvas de congelamento e descongelamento do *surimi-like* contendo diferentes crioprotetores. Durante o congelamento ocorre um estágio inicial (estágio I) no qual as amostras de *surimi-like* são pré-resfriadas até a temperatura inicial de congelamento. No estágio subsequente (estágio II) é visto a remoção do calor latente de fusão das amostras, devido a nucleação e crescimento dos cristais de gelo. Finalmente no último estágio (estágio III) a temperatura do produto congelado é reduzida até a temperatura final de armazenamento (Zhu et al., 2019). Nota-se que o ponto de super-resfriamento não foi registrado nas curvas, o que pode ser atribuído à alta taxa de resfriamento utilizada.

No segundo estágio do congelamento (estágio II), parte significativa dos cristais de gelo é formada. O tempo que cada amostra permaneceu nesta etapa foi de, 12,33 min para a amostra C1 (4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio), 16,35 min para amostra C2 (sem crioprotetores), 15,06 min para a amostra com 2 % de CNF, 16,65 min para a amostra com 4 % de CNF e 18,08 min para a amostra com 6 % de CNF. Os resultados indicaram que 2 % de CNF reduziu o tempo desta etapa quando comparado com à amostra isenta de crioprotetores (C2). Entretanto, o tempo de permanência no segundo estágio (estágio II) deste tratamento foi superior ao da amostra contendo crioprotetores comerciais (C1). Já as amostras com concentrações maiores que 2 % de CNF apresentaram tempo de congelamento superior ao tratamento C2. O congelamento em menor tempo auxilia na formação de cristais de gelo menores, minimizando os danos estruturais. Provavelmente, concentrações maiores de CNF atuaram reduzindo a condutividade térmica do *surimi-like*, impactando em um tempo ligeiramente superior para o segundo estágio do congelamento (estágio II). Nota-se ainda que a amostra C1 apresentou uma menor temperatura de início de congelamento quando comparada aos demais tratamentos, indicando que a adição de CNF não reduziu o ponto de início de congelamento.

Embora os materiais com dimensões nanométricas, como a nanocelulose, possam atuar induzindo a nucleação de gelo em produtos congelados (Welti et al., 2009), esse comportamento não foi observado. Provavelmente, em altas concentrações, parte das fibrilas interagem entre si e se agregam, reduzindo sua atuação na nucleação do gelo (Li et al., 2020). Além disso, parte das fibras de celulose podem ter interagido com a água presente no produto, limitando sua mobilidade e retardando o seu congelamento. Finalmente, durante as etapas do descongelamento (estágios IV, V e VI), as amostras contendo CNF demandaram mais tempo para chegarem na temperatura final de 8 °C. Este resultado também pode ser atribuído a interação da CNF com as moléculas de água.

### **3.2 Alterações na qualidade do *surimi-like* após diferentes tempos de armazenamento com flutuação de temperatura**

#### **3.2.1 Oxidação lipídica, teor de proteínas solúveis em sal e hidrofobicidade**

A oxidação lipídica (índice de TBARS), a hidrofobicidade das proteínas e o teor de proteínas solúveis em sal do *surimi-like* são mostrados na Tabela 1. Para os três parâmetros avaliados, a interação entre o tratamento e o tempo aplicado nas amostras não foi significativa ( $p > 0,05$ ). O índice de TBARS foi afetado ( $p < 0,05$ ) apenas pelo tratamento, não houve diferença

significativa ( $p > 0,05$ ) entre as concentrações de malonaldeído (MAD) quando o produto foi armazenado por 5 ou 60 dias. Acredita-se que o tempo de armazenamento das amostras não foi suficiente para haver degradação dos lipídeos com formação de mais compostos secundários. Comparado aos demais tratamentos, o tratamento C1 exibiu altas concentrações de malonaldeído. Contudo, este resultado não está associado a peroxidação lipídica, mas à presença de sacarose na amostra. A sacarose é uma substância que reage com o TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) gerando um cromogênio que absorve a 532 nm (Baumgartner et al., 1975), o que promoveu o aumento da absorbância durante a análise da amostra C1.

Tabela 1 – Oxidação lipídica (índice de TBARS), teor de proteínas solúveis em sal e hidrofobicidade de *surimi-like* congelado

Efeitos	Fonte de variação	Índice de TBARS ( $\mu\text{g/g}$ )	Teor de proteínas solúveis em sal ( $\text{mg/g}$ )	Hidrofobicidade ( $\mu\text{g/mg}$ )
Tratamento, T	C1	4,08 <sup>a</sup>	10,64 <sup>a</sup>	29,11
	C2	0,84 <sup>b</sup>	8,42 <sup>b</sup>	30,88
	2% CFN	0,85 <sup>b</sup>	10,49 <sup>a</sup>	29,58
	4% CFN	0,88 <sup>b</sup>	9,12 <sup>b</sup>	29,51
	6% CFN	0,84 <sup>b</sup>	9,05 <sup>b</sup>	32,57
Tempo de armazenamento, A (dias)	5	1,53	10,79 <sup>a</sup>	28,12 <sup>b</sup>
	60	1,46	8,29 <sup>b</sup>	32,53 <sup>a</sup>
	SEM	0,24	0,34	0,97
Pr > F	T	<b>&lt;0,000</b>	<b>0,010</b>	0,795
	A	0,106	<b>&lt;0,000</b>	<b>0,036</b>
	TxA	0,704	0,584	0,829

MDA: malonaldeído; CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.

\*T: tratamentos; A: armazenamento; T x A: interação tratamento e armazenamento; SEM: erro padrão

\*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, dentro dos efeitos, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste Duncan.

O *surimi-like* apresenta elevado conteúdo proteico de forma que durante o armazenamento congelado com flutuação de temperatura, suas proteínas sofrem alterações estruturais. Ao realizar a extração das proteínas solúveis em sal, que são compostas predominantemente por proteínas miofibrilares, é possível avaliar as modificações sofridas por essa macromolécula durante o armazenamento. O tratamento não influenciou a hidrofobicidade das proteínas ( $p > 0,05$ ), somente o tempo de armazenamento influenciou esta variável. Houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da hidrofobicidade dessas proteínas no final

do período de 60 dias de estocagem (Tabela 1). Esse comportamento é atribuído ao desdobramento proteico e consequente exposição de aminoácidos hidrofóbicos na superfície das proteínas de modo que há um aumento da incidência de interações hidrofóbicas e consequente desnaturação proteica (Chelh et al., 2006).

Além dos aminoácidos hidrofóbicos, no congelamento, os grupos sulfidrilas também são expostos gerando ligações dissulfeto entre as proteínas e, ainda, podem ocorrer ligações de hidrogênio e interações iônicas. Todos estes eventos possibilitam a agregação das proteínas resultando na diminuição de sua solubilidade (Chen et al., 2022; Li et al., 2022). Embora a análise de hidrofobicidade não tenha demonstrado discrepância entre os tratamentos, foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de proteínas solúveis entre os diferentes tratamentos e tempos avaliados (Tabela 1). O tempo promoveu uma redução do teor de proteínas solúveis em sal, devido ao processo de oxidação proteica resultado das diferentes interações entre as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos. Nas amostras contendo crioprotetores comerciais (C1) e 2 % de CNF os teores de proteínas solúveis foram maiores ( $p < 0,05$ ). O tratamento C2 (amostra sem crioprotetores) foi o tratamento que apresentou menor solubilidade das proteínas. Li et al. (2022) ao empregarem celulose nanocristalina em surimi de peixe (*Nemipterus virgatus*) observaram um comportamento similar.

### 3.2.2 Concentração de sulfidrilas e carbonila em proteínas do *surimi-like*

A Fig. 2 exhibe as concentrações de sulfidrilas totais e carbonila nas proteínas miofibrilares do *surimi-like*. Para essas variáveis, a interação tratamento e tempo de armazenamento foi significativa ( $p < 0,05$ ). As amostras sem crioprotetores (C2) apresentaram uma redução mais acentuada da concentração de grupos sulfidrilas totais na superfície das proteínas, indicando que houve uma maior oxidação desses grupos em ligações cruzadas dissulfeto (Lin et al., 2019; Zhang et al., 2022). A ausência de crioprotetores colaborou para que este tratamento sofresse maior oxidação proteica (Fig. 2a) depois de 60 dias de armazenamento congelado. Para surimi de carpa prateada, Zhang et al. (2020) encontraram para o grupo isento de crioprotetores um valor maior para a concentração de sulfidrilas ( $2,71 \text{ mol}/10^5 \text{ g}$ ), visto que utilizaram carne de peixe recém abatido.

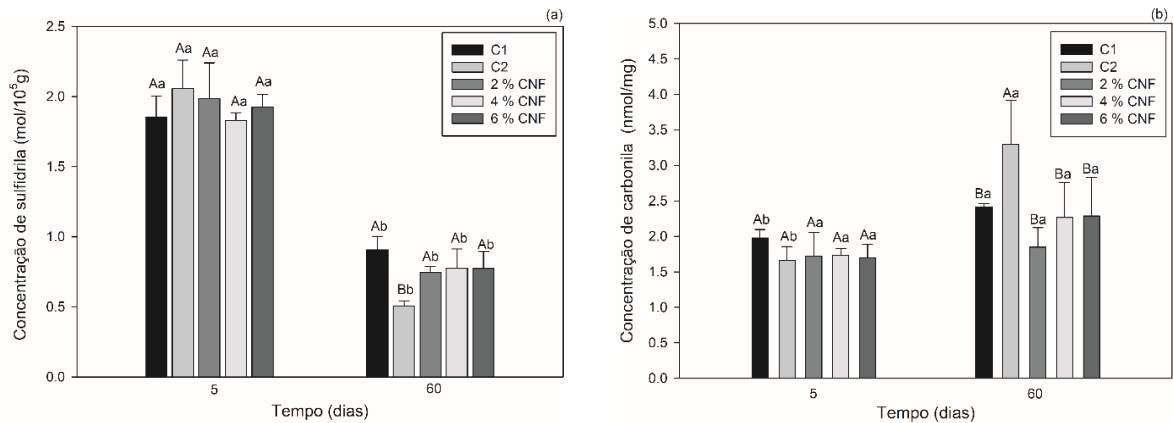


Fig. 2 – Caracterização da oxidação das proteínas de *surimi-like* congelado: (a) Concentração de sulfidril, (b) Concentração de carbonila. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato; C2: controle negativo, isento de crioprotetores. As barras representam valores médios e as barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra maiúscula (<sup>A,B</sup>) entre os tratamentos em cada tempo, e minúsculas (<sup>a,b</sup>), para um mesmo tratamento no tempo, não diferem ( $p > 0,05$ ).

A oxidação proteica também pode ser mensurada pela quantificação da concentração de compostos carbonílicos formados a partir da carbonilação de cadeias laterais de aminoácidos, como prolina, arginina e lisina (Chen et al., 2022; Wang et al., 2023a). Este processo é desencadeado devido à ação de proteases (catepsinas e metaloproteinase de matriz), oxidases (citocromo oxidase e lipoxigenase) (Nian et al., 2019) e pela presença de substâncias reativas ao oxigênio (Xia et al., 2009) presente na própria matriz. Com o tempo de armazenamento, a concentração de carbonilas nas proteínas miofibrilares do *surimi-like* aumentou, sendo a amostra C2 aquela que exibiu maior concentração desses compostos (Fig. 2b). Os resultados encontrados, para todos os tratamentos foram ligeiramente inferiores aos relatados por Wang et al. (2023a) e Zhang et al. (2020) para surimi de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*).

Para ambas as análises, o controle negativo (C2) exibiu degradação proteica mais severa, enquanto o comportamento das amostras adicionadas de crioprotetores comerciais, 2, 4 ou 6 % m/m de CNF apresentaram maior inibição da oxidação proteica. Como não foi visto diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos contendo CNF e o controle C1 (Fig. 2), percebe-se que a CNF atuou inibindo eficazmente a degradação proteica em *surimi-like* durante o congelamento com oscilação de temperatura.

### 3.2.3 Mudanças estruturais em proteínas do *surimi-like* congelado

As degradações e alterações conformacionais das proteínas que compõem o *surimi-like* foram verificadas pela análise de eletroforese (SDS-PAGE) e FTIR. Os géis de eletroforese das proteínas extraídas do *surimi-like* em diferentes tempos de armazenamento são mostrados na Fig. 3a. Com apenas 5 dias de congelamento é possível observar bandas de proteínas próximo a 200 kDa, 55 kDa, 45 kDa e 24 kDa relacionadas às cadeias de miosina, desmina, actina e troponina, respectivamente (Ali et al., 2022; Wang et al., 2023a; Zhang et al., 2022). Após 60 dias de armazenamento congelado com flutuações de temperatura nota-se que as bandas de miosina e actina tiveram um enfraquecimento indicando que houve uma degradação dessas proteínas, possivelmente devido à oxidação proteica verificada anteriormente pelas análises de solubilidade de proteínas em sal, sulfidril e carbonila.

Os espectros de FTIR das proteínas de *surimi-like* armazenados por 5 e 60 dias são apresentados na Fig. 3b. As amostras exibiram uma banda em aproximadamente  $3345\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída à vibração de alongamento N-H (Zhang et al., 2022) e picos na região de  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento C-H (Wang et al., 2023a). Ambas as ligações estão presentes nos aminoácidos formadores das proteínas miofibrilares.

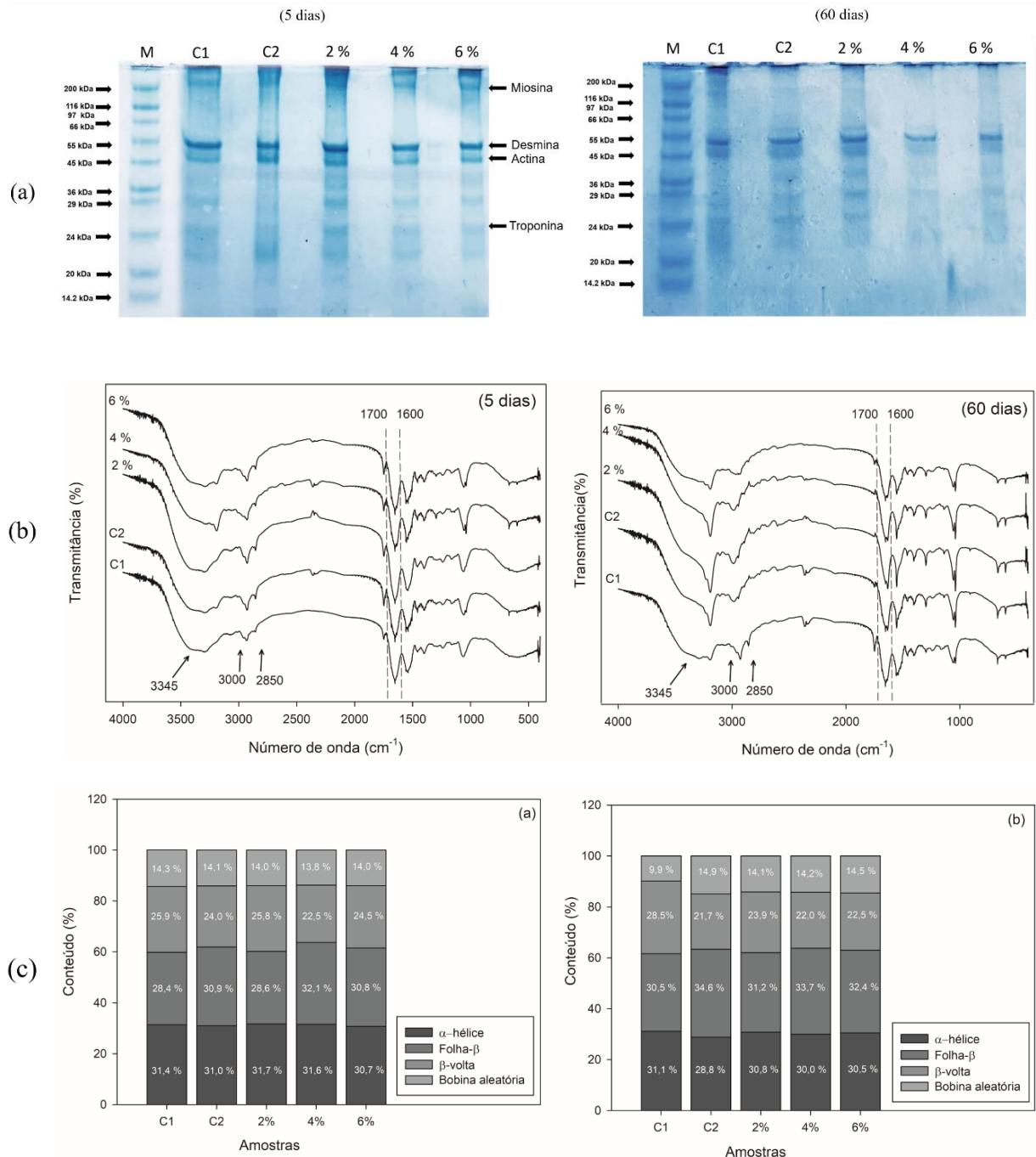


Fig. 3 – Caracterização das proteínas do *surimi-like* armazenado em diferentes tempos: (a) Gel de SDS-PAGE; (b) FTIR das proteínas; (c) Conteúdo de estrutura secundária. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.

A banda de amida I ( $1600$  a  $1700$   $\text{cm}^{-1}$ ) foi usada para estudar a estrutura secundária das proteínas do *surimi-like*. Para isso, foi realizada uma deconvolução e ajuste da segunda derivada dessa banda (S Fig. 1). As estruturas  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -volta, folha- $\beta$  e bobina aleatória foram atribuídas às áreas de pico de absorção de  $1650$ – $1660$ ,  $1660$ – $1700$ ,  $1610$ – $1640$  e  $1640$ – $1650$

$\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Wang et al., 2023a). As amostras apresentaram uma diminuição no conteúdo de  $\alpha$ -hélice e aumento no conteúdo de folha- $\beta$  (Fig. 3c), devido aos danos mecânicos e as novas interações proteicas ocasionados pela formação dos cristais de gelo (Li et al., 2023).

As amostras C1 (controle positivo) e 2 % de CNF exibiram maiores conteúdos de estrutura secundária  $\alpha$ -hélice e menores de folha- $\beta$  após 60 dias de armazenamento, indicando que esses crioprotetores atuaram oferecendo maior estabilidade à manutenção da estrutura secundária das proteínas miofibrilares durante o congelamento com oscilação de temperatura. Este efeito está associado à influência que a sacarose, o sorbitol e a CNF exercem sobre a cristalização de gelo, devido à formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água, bem como, à interação desses compostos com os resíduos de aminoácidos polares das proteínas (Tan et al., 2022). O desempenho da amostra C1 foi ligeiramente superior, pois a maior porcentagem de  $\beta$ -voltas e a menor porcentagem de bobinas aleatórias foram observados neste tratamento (Li et al., 2023).

### **3.3 Propriedades do gel de *surimi-like***

#### **3.3.1 Interação do gel de *surimi-like* com água**

As propriedades do gel de surimi podem ser influenciadas principalmente pela concentração de água presente em sua composição (Wang et al., 2023a). Assim, neste experimento, foram avaliadas as perdas de água por descongelamento e cozimento, além da capacidade de retenção de água (CRA) do gel. Analisando a perda de fluidos por descongelamento, foi observado influência significativa ( $p < 0,05$ ) dos fatores tratamento, tempo de armazenamento e da interação entre estes fatores (Fig. 4). Após 60 dias de armazenamento com ciclagem térmica todas as amostras de *surimi-like* exibiram maior perda de água por descongelamento quando comparado aos tratamentos com 5 dias de armazenamento. Esse resultado foi atribuído à oxidação proteica e à recristalização de gelo ocorridas nas amostras durante a estocagem. A recristalização do gelo é um fenômeno desencadeado pela flutuação de temperatura e consiste no desaparecimento dos cristais de gelo menores e formação de cristais de gelo maiores causando danos estruturais irreversíveis no produto alimentício (Walayat et al., 2022).

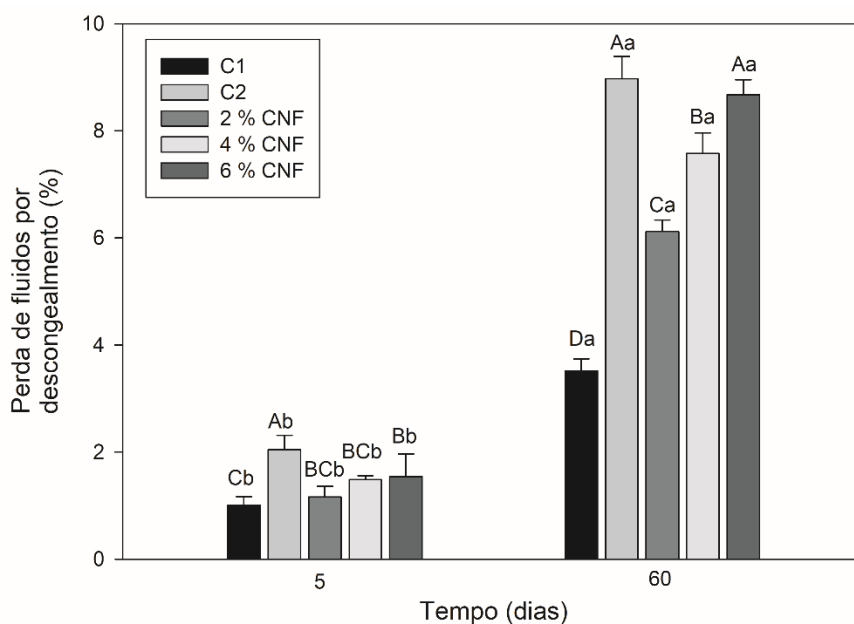


Fig. 4 – Perda de fluidos do *surimi-like* de frango por descongelamento. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores. As barras representam valores médios e as barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra maiúscula <sup>(A,B)</sup> entre os tratamentos em cada tempo, e minúsculas <sup>(a,b)</sup>, para um mesmo tratamento no tempo, não diferem ( $p > 0,05$ ).

O gel de *surimi-like* de frango foi obtido por cocção da massa cárnea lavada após estocagem, as temperaturas elevadas promoveram a desnaturação e agregação irreversível das proteínas resultando em um gel tridimensional (Zhang et al., 2020). A perda de água por cozimento e a CRA do gel de *surimi-like* foram mensuradas e foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dessas variáveis com o tratamento empregado (Tabela 2). Os crioprotetores empregados nos tratamentos C1 e 2 % de CNF resultaram em géis com menores perdas por cocção e maiores CRA, indicando que as proteínas sofreram menor degradação pelo armazenamento congelado com flutuação de temperatura. Maior CRA indicam que as proteínas destas amostras possuíam maior solubilidade e funcionalidade (Ramos & Gomide, 2017), enfatizando que a aplicação de 2 % de CNF tem desempenho semelhante aos crioprotetores comerciais. As perdas por cocção encontradas no término da estocagem foram ligeiramente superiores à perda de 22,45 % alcançada por Massingue et al. (2021) para *surimi-like* de carne de peru desossada mecanicamente.

Tabela 2 – Propriedades de interação da água com o gel de *surimi-like* de frango

Efeitos	Fonte de variação	Perda de fluidos por cozimento (%)	Capacidade de retenção de água do gel (%)
Tratamento, T	C1	22,39 <sup>d</sup>	88,81 <sup>a</sup>
	C2	37,64 <sup>a</sup>	84,93 <sup>b</sup>
	2% CFN	26,78 <sup>c</sup>	87,23 <sup>a</sup>
	4% CFN	34,86 <sup>ab</sup>	85,21 <sup>b</sup>
	6% CFN	33,74 <sup>b</sup>	84,26 <sup>b</sup>
Tempo de armazenamento, A (dias)	5	27,42 <sup>b</sup>	86,33
	60	34,74 <sup>a</sup>	85,85
	SEM	1,34	0,41
Pr > F	T	<b>&lt;0,000</b>	<b>&lt;0,000</b>
	A	<b>&lt;0,000</b>	0,402
	TxA	0,740	0,492

CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.

\*T: tratamentos; A: armazenamento; T x A: interação tratamento e armazenamento; SEM: erro padrão

\*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, dentro dos efeitos, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste Duncan.

### 3.3.2 Textura do gel de *surimi-like*

A textura do gel de *surimi-like* é um aspecto sensorial importante ao consumidor e está intimamente relacionada à degradação proteica em baixas temperaturas. Com o objetivo de simular a mastigação do gel proteico, as amostras de *surimi-like* de frango foram submetidas ao teste TPA. Para a dureza, mastigabilidade e coesividade, a interação entre os fatores tratamento e tempo não foi significativa ( $p > 0,05$ ). No entanto, para a dureza o tempo de armazenamento teve efeito significativo e para mastigabilidade foi visto efeito significativo em razão do tratamento aplicado (Tabela 3).

Tabela 3 – Propriedades texturais do gel de *surimi-like* de frango

Efeitos	Fonte de variação	Dureza (N)	Mastigabilidade (N.mm)	Coesividade
Tratamento, T	C1	43,45	21,67 <sup>b</sup>	0,623
	C2	41,37	21,59 <sup>b</sup>	0,616
	2% CNF	43,92	24,66 <sup>a</sup>	0,643
	4% CNF	41,88	20,43 <sup>b</sup>	0,633
	6% CNF	41,80	21,85 <sup>b</sup>	0,625
	Tempo de armazenamento, A (dias)	5	44,50 <sup>a</sup>	22,65
	60	40,47 <sup>b</sup>	21,44	0,624
	SEM	0,79	0,00	0,43
Pr > F	T	0,779	<b>0,025</b>	0,221
	A	<b>0,015</b>	0,121	0,332
	TxA	0,689	0,858	0,788

CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.

\*T: tratamentos; A: armazenamento; T x A: interação tratamento e armazenamento; SEM: erro padrão.

\*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, dentro dos efeitos, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste Duncan.

Para a dureza, foi visto uma redução desse parâmetro nos tratamentos com o tempo, graças ao processo de recristalização do gelo e consequente enfraquecimento da rede proteica. O presente trabalho apresentou valores de dureza superior ao obtido por Wang et al. (2023b) para surimi de carpa capim acrescido de oligossacarídeos de farelo de arroz (24,6 N) e inferior a 46,31 N detectado por Massingue et al. (2021) para *surimi-like* de peru .

O tratamento contendo 2 % de CNF apresentou maior mastigabilidade, pois essa amostra exibiu menores danos mecânicos gerando um produto com menor perda de água e alta CRA (Tabela 2), fatores que atribuem maior firmeza ao produto, devido a maior turgescência das proteínas (Ramos & Gomide, 2017). Além disso, essa amostra também apresentou pouca oxidação proteica (Figura 2) de forma que a capacidade de formar gel das proteínas foi preservada (Zhang et al., 2020).

Os tratamentos apresentaram coesividades média de aproximadamente 0,62. Massingue et al. (2021) e Zhang et al. (2020) obtiveram resultados de coesividade inferiores ao analisar *surimi-like* de peru (0,41) e *surimi* de carpa prateada adicionado de sacarose e hidrolisado de subprodutos do processamento de *surimi* (0,56), respectivamente.

### 3.3.3 Microestrutura do gel de *surimi-like* armazenado congelado

As alterações microestruturais dos géis de *surimi-like* com diferentes crioprotetores durante o armazenamento congelado com alterações de temperaturas foram cheçadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fig. 5). As micrografias revelaram que depois de 60 dias de armazenamento, as amostras apresentaram uma rede proteica mais porosa e espaçada, ocasionada pela formação de cristais de gelo maiores durante o processo de recristalização do gelo. A amostra C2, 4 % de CNF e 6 % de CNF exibiram aparência de redes frouxas, escamosas e quebradiças, enquanto nas amostras C1 e 2 % de CNF pode-se ver uma superfície mais compacta, homogênea e com menor presença de poros. Acredita-se que a adição de sacarose e sorbitol ou CNF em menores concentrações atenuam a recristalização de gel, pois interagem com a água influenciando na formação de cristais de gelo (Meira et al., 2024; Tan et al., 2022). Assim, os danos físicos na estrutura das proteínas pelo crescimento dos cristais foram minimizados nestes tratamentos.

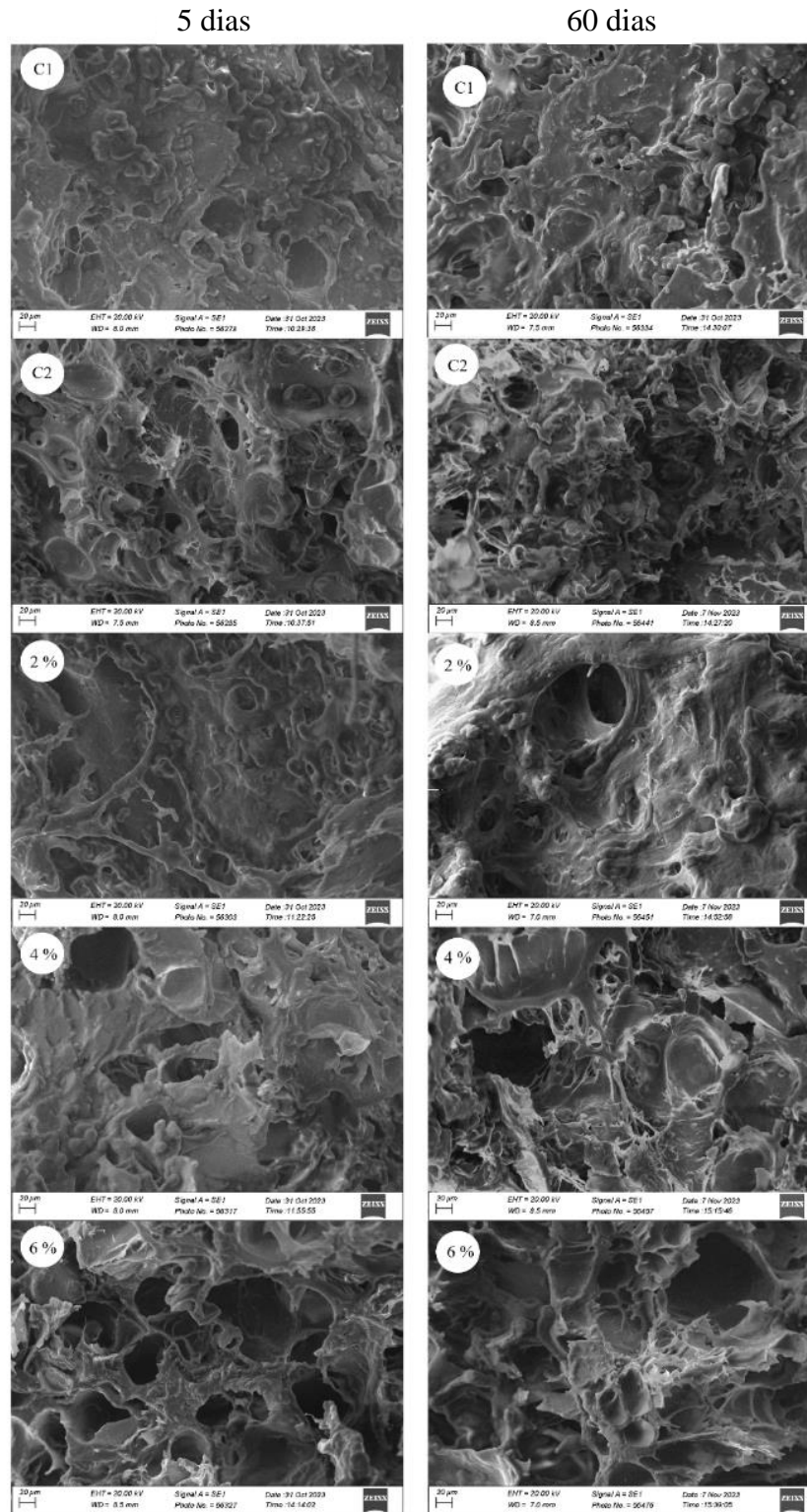


Fig. 5 – Microestrutura de *surimi-like* adicionados com diferentes crioprotetores. Aumento de 500 x. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % de açúcar, 4 % de sorbitol e 0,2 % de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores

## 4 CONCLUSÃO

O armazenamento congelado com flutuação de temperatura de *surimi-like* de MSCM induziu a oxidação e degradação da estrutura proteica desse produto. Neste estudo, foi possível perceber que a CNF foi capaz de minimizar esses impactos negativos causados pela recristalização do gelo na mesma proporção que os crioprotetores comerciais tradicionais (sacarose, sorbitol e tripolifosfato de sódio). A aplicação de 2 % de CNF atuou efetivamente amenizando a desnaturação das proteínas miofibrilares, conforme evidenciado pela alta solubilidade dessas moléculas em sal ( $9,62 \pm 1,13$  mg/g), menor teor de carbonila, menores percentuais de perdas de água, devido ao descongelamento e cocção ( $30,24 \pm 2,20$  %), alta capacidade de retenção de água do gel ( $86,78 \pm 1,56$  %) e microestrutura mais homogêneas e coesa. As proteínas do *surimi-like* contendo 2 % de CNF também apresentaram poucas alterações de sua estrutura secundária após 60 dias de estocagem pela análise de FTIR. Entretanto, concentrações de CNF superiores a 2 % não exibiram resultados satisfatórios. Acredita-se que em altas concentrações, essas fibrilas de celulose reduziram sua interação com as proteínas miofibrilares e a água circundante e passaram a interagir entre si. Em conclusão, a adição de 2 % de CNF na formulação de *surimi-like* promoveu a manutenção da estrutura proteica do produto sob o congelamento com variação de temperatura. Sugere-se que, concentrações inferiores sejam exploradas em trabalhos futuros.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Concessão número 308911/2021-0) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Número da outorga – APQ – 01805-21). Os autores agradecem à Central de Análises e Prospecção Química e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras, bem como à Finep, Fapemig, Capes e CNPq pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo infravermelho com transformada de Fourier análises de espectroscopia e microscopia eletrônica. Os autores também gostariam de agradecer à Embrapa Agroindústria de Alimentos pela análise de calorimetria exploratória diferencial.

## 6 REFERÊNCIAS

- Ali, S., Ammar Khan, M., Rajput, N., Naeem, M., Zhang, W., Li, C. bao, & Zhou, G. (2022). Desmin as molecular chaperone for myofibrillar degradation during freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, 386(October 2021), 132691. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132691>
- Alzate-Arbeláez, A. F., Dorta, E., López-Alarcón, C., Cortés, F. B., & Rojano, B. A. (2019). Immobilization of Andean berry (*Vaccinium meridionale*) polyphenols on nanocellulose isolated from banana residues: A natural food additive with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 294(September 2018), 503–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.085>
- Andrade, B. F., Guimarães, A. S., do Carmo, L. R., Tanaka, M. S., Fontes, P. R., Ramos, A. de L. S., & Ramos, E. M. (2024). S-nitrosothiols as nitrite alternatives: Effects on residual nitrite, lipid oxidation, volatile profile, and cured color of restructured cooked ham. *Meat Science*, 209(November 2023). <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109397>
- Baumgartner, W. A., Baker, N., Hill, V. A., & Wright, E. T. (1975). Novel interference in thiobarbituric acid assay for lipid peroxidation. *Lipids*, 10(5), 309–311. <https://doi.org/10.1007/BF02532707>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Campo-Deaño, L., Tovar, C. A., Jesús Pombo, M., Teresa Solas, M., & Javier Borderías, A. (2009). Rheological study of giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) made by two methods with different cryoprotectants added. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.024>
- Chelh, I., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science*, 74(4), 681–683. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.05.019>
- Chen, H., Zhang, M., & Rao, Z. (2021). Effect of ultrasound-assisted thawing on gelling and 3D printing properties of silver carp surimi. *Food Research International*, 145(September 2020), 110405. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110405>

- Chen, X., Xiaozhen, L., Yang, F., Wu, J., Huang, D., Huang, J., & Wang, S. (2022). Effects and mechanism of antifreeze peptides from silver carp scales on the freeze-thaw stability of frozen surimi. *Food Chemistry*, 396(March), 133717.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133717>
- Cortez-Vega, W. R., Fonseca, G. G., & Prentice, C. (2015). Optimization of parameters for obtaining surimi-like material from mechanically separated chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 763–772.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1056-1>
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
- Griffith, M., & Ewart, K. V. (1995). Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology Advances*, 13(3), 375–402.
- Hui, Y. H., Aalhus, J. L., Cocolin, L., Guerrero-Legarreta, I., Nollet, L. M., Purchas, R. W., Schilling, M. W., Stanfield, P., & Xiong, Y. L. (2012). *Handbook of Meat and Meat Processing, Second Edition* (2nd ed.). CRC Press/Taylor & Francis.  
<https://books.google.com/books?id=RWPRBQAAQBAJ&pgis=1>
- Jin, S. K., Kim, I. S., Choi, Y. J., Park, G. B., & Yang, H. S. (2008). Quality characteristics of chicken breast Surimi as affected by water washing time and pH adjustment. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(3), 449–455.  
<https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70424>
- Li, H., Wang, Q., Li, W., & Xia, X. (2023). Cryoprotective Effect of NADES on Frozen-Thawed Mirror Carp Surimi in Terms of Oxidative Denaturation, Structural Properties, and Thermal Stability of Myofibrillar Proteins. *Foods*, 12(19).  
<https://doi.org/10.3390/foods12193530>
- Li, T., Li, M., Zhong, Q., & Wu, T. (2020). Effect of Fibril Length on the Ice Recrystallization Inhibition Activity of Nanocelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 240(March), 116275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116275>
- Li, Z., Wang, Q., Li, S., Chang, Y., Zheng, X., Cao, H., & Zheng, Y. (2022). Usage of nanocrystalline cellulose as a novel cryoprotective substance for the *Nemipterus virgatus* surimi during frozen storage. *Food Chemistry: X*, 16(November), 100506.  
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100506>

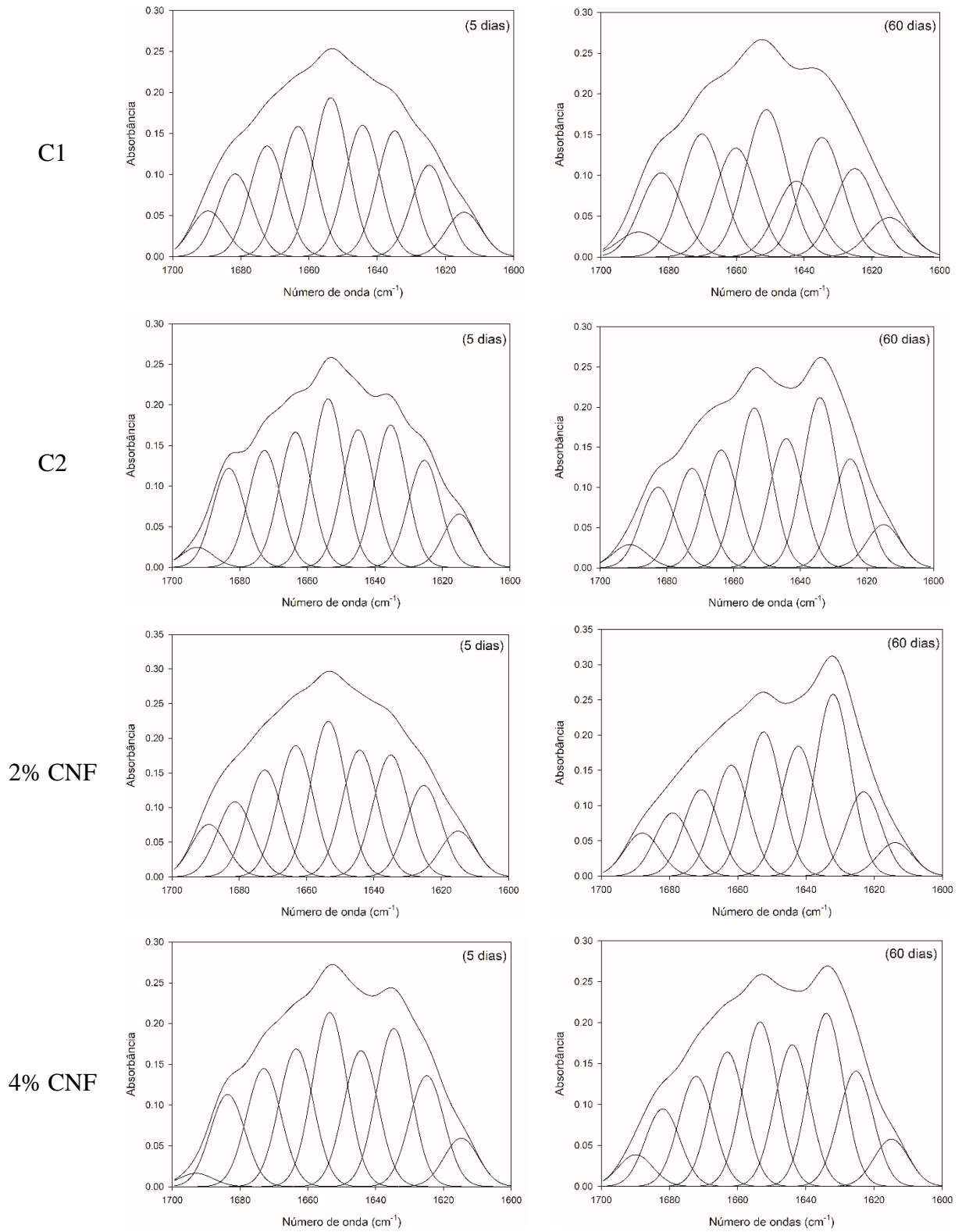
- Lin, J., Hong, H., Zhang, L., Zhang, C., & Luo, Y. (2019). Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in preventing denaturation of frozen surimi. *Food Chemistry*, 298(May), 124868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.142>
- Massingue, A. A., De Oliveira Paula, M. M., Rocha, A. P., De Barros Silva Haddad, G., Do Carmo, E. L., De Lemos Souza Ramos, A., & Ramos, E. M. (2021). Texture profile of surimi-like material from mechanically deboned turkey meat. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.34519>
- Massingue, A. A., Paula, M. M. de O., Haddad, G. de B. S., Gonçalves, M. C., Silva, V. R. O., Ramos, A. L. de S., & Ramos, E. M. (2022). Effect of incorporating surimi-like material from mechanically deboned turkey meat on physicochemical and sensory characteristics of ready-to-eat broiler breast meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(5), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16524>
- Meira, A. C. F. de O., de Moraes, L. C., Setter, C., Veríssimo, L. A. A., Carvalho, C. W. P., & de Resende, J. V. (2024). Cryoprotective Potential of Cellulose Nanofibers and Gelatin Hydrolysate in Frozen Potatoes. *Food and Bioprocess Technology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03360-w>
- Mi, H., Zhao, B., Wang, C., Yi, S., Xu, Y., & Li, J. (2017). Effect of 6-gingerol on physicochemical properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi fortified with perilla oil during refrigerated storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14), 4807–4814. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8350>
- Nechyporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2016). Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, 93, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>
- Nian, L., Cao, A., Cai, L., Ji, H., & Liu, S. (2019). Effect of vacuum impregnation of red sea bream (*Pagrosomus major*) with herring AFP combined with CS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles during freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, 291(November 2018), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.017>
- Perumal, A. B., Nambiar, R. B., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2022). Nanocellulose: Recent trends and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 127(January), 107484. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107484>

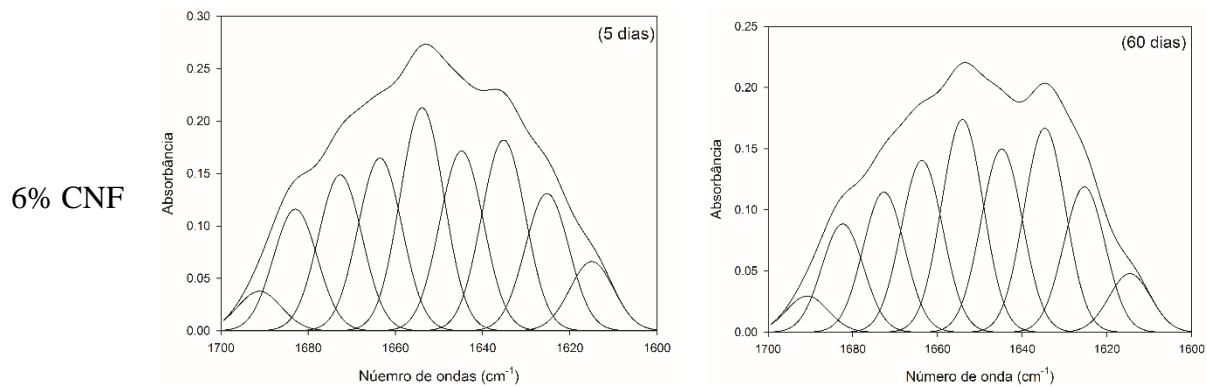
- Püssa, T., Raudsepp, P., Toomik, P., Pällin, R., Mäeorg, U., Kuusik, S., Soidla, R., & Rei, M. (2009). A study of oxidation products of free polyunsaturated fatty acids in mechanically deboned meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.01.014>
- Ramadhan, K., Huda, N., & Ahmad, R. (2012). Freeze-thaw stability of duck surimi-like materials with different cryoprotectants added. *Poultry Science*, 91(7), 1703–1708. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01926>
- Ramos, E. M., & Gomide, L. A. M. (2017). *Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias* (2nd ed.). Editora UFV.
- Spiteller, P., Kern, W., Reiner, J., & Spiteller, G. (2001). Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1531(3), 188–208. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00100-7](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00100-7)
- Tan, M., Ding, Z., Yang, D., & Xie, J. (2022). The quality properties of frozen large yellow croaker fillets during temperature fluctuation cycles: improvement by cellobiose and carboxylated cellulose nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194(November 2021), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.093>
- Walayat, N., Tang, W., Nawaz, A., Ding, Y., Liu, J., & Lorenzo, J. M. (2022). Influence of Konjac oligo-glucomannan as cryoprotectant on physicochemical and structural properties of silver carp surimi during fluctuated frozen storage. *Lwt*, 164(March), 113641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113641>
- Walayat, N., Xiong, H., Xiong, Z., Moreno, H. M., Nawaz, A., Niaz, N., & Randhawa, M. A. (2020). Role of Cryoprotectants in Surimi and Factors Affecting Surimi Gel Properties: A Review. *Food Reviews International*, 00(00), 1–20. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1768403>
- Wang, C., Rao, J., Li, X., He, D., Zhang, T., Xu, J., Chen, X., Wang, L., Yuan, Y., & Zhu, X. (2023a). Chickpea protein hydrolysate as a novel plant-based cryoprotectant in frozen surimi: Insights into protein structure integrity and gelling behaviors. *Food Research International*, 169(April), 112871. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112871>
- Wang, Y., Wang, D., Liu, J., & Yu, X. (2023b). Effects of rice bran feruloyl oligosaccharides on gel properties and microstructure of grass carp surimi. *Food Chemistry*, 407(June 2022), 135003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135003>

- Welti, A., Stetzer, O., & Lohmann, U. (2009). Atmospheric Chemistry and Physics Influence of particle size on the ice nucleating ability of mineral dusts. *Atmos. Chem. Phys*, *9*, 6705–6715. [www.atmos-chem-phys.net/9/6705/2009/](http://www.atmos-chem-phys.net/9/6705/2009/)
- Xia, X., Kong, B., Liu, Q., & Liu, J. (2009). Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze-thaw cycles. *Meat Science*, *83*(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.003>
- Zhang, L., Li, Q., Hong, H., & Luo, Y. (2020). Prevention of protein oxidation and enhancement of gel properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi by addition of protein hydrolysates derived from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, *316*(December 2019), 126343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126343>
- Zhang, X., Zhang, Y., Dong, Y., Ding, H., Chen, K., Lu, T., & Dai, Z. (2022). Study on the mechanism of protein hydrolysate delaying quality deterioration of frozen surimi. *Lwt*, *167*(April), 113767. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113767>
- Zhu, S., Yu, J., Chen, X., Zhang, Q., Cai, X., Ding, Y., Zhou, X., & Wang, S. (2021). Dual cryoprotective strategies for ice-binding and stabilizing of frozen seafood: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *111*(August 2020), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.069>
- Zhu, Zhou, Q., & Sun, D. W. (2019). Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, *90*(April), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.012>

## ANEXO A

## Material suplementar





S Fig. 1 – Caracterização das proteínas do surimi-like de MSCM, ajuste da curva gaussiana da banda amida I do FTIR. CNF: nanofibras de celulose; C1: controle positivo, 4 % m/m de açúcar, 4 % m/m de sorbitol e 0,2 % m/m de tripolifosfato de sódio; C2: controle negativo, isento de crioprotetores.

## TERCEIRA PARTE

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de crioprotetores em alimentos congelados permite reduzir danos mecânicos em alimentos, preservando sua qualidade físico-química, sensorial e nutricional. Neste sentido, o presente trabalho de tese investigou o potencial crioprotetor de nanofibras de celulose (CNF) e hidrolisado de gelatina (GH) e concluiu que a aplicação combinada de 2,20 % m/m de hidrolisado de gelatina e 2,20 % m/m de nanofibras de celulose em batatas congeladas reduziu os danos microestruturais e conseqüentemente, as perdas de fluidos celulares por descongelamento ( $19,06 \pm 0,51$  % e  $28,71 \pm 0,21$  %, respectivamente) e alteração na textura ( $23,30 \pm 0,54$  % e  $41,95 \pm 0,55$  %, respectivamente), quando submetidas ao armazenamento congelado com e sem flutuação de temperatura. E a aplicação apenas de nanofibras de celulose (2 % m/m) em *surimi-like* de carne mecanicamente separada de frango atuou reduzindo a oxidação proteica, uma vez que, alta concentração de proteínas solúveis em sal ( $9,62 \pm 1,13$  mg/g), menores perdas de água por descongelamento ( $6,12 \pm 0,21$  %) e cocção ( $30,24 \pm 2,20$  %), elevada capacidade de retenção de água ( $86,78 \pm 1,56$  %) e estrutura proteica mais firme e homogênea foram observados. Os resultados encontrados indicam que esses compostos são substâncias promissoras na criopreservação de alimentos de origem vegetal e animal.